

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Luiza Mezzomo Donatti

**ANÁLISE TEMPORAL DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES CAUSADOS PELA  
MONOCROTALINA EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Porto Alegre

2017

Luiza Mezzomo Donatti

**ANÁLISE TEMPORAL DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES CAUSADOS PELA  
MONOCROTALINA EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Trabalho de conclusão de curso de Graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Fisiologia

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

Co-orientadora: MsC. Bruna Gazzi de Lima Seolin

Porto Alegre

2017

#### CIP - Catalogação na Publicação

Donatti, Luiza Mezzomo  
ANÁLISE TEMPORAL DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES  
CAUSADOS PELA MONOCROTALINA EM MODELO DE HIPERTENSÃO  
ARTERIAL PULMONAR / Luiza Mezzomo Donatti. -- 2017.  
94 f.

Orientadora: Adriane Belló-Klein.  
Coorientadora: Bruna Gazzi de Lima-Seolin.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Fisiologia Cardiovascular. 2. Hipertensão  
arterial pulmonar. 3. Monocrotalina. 4. Reatividade  
vascular. 5. Estresse oxidativo. I. Belló-Klein,  
Adriane, orient. II. de Lima-Seolin, Bruna Gazzi,  
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Luiza Mezzomo Donatti

**ANÁLISE TEMPORAL DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES CAUSADOS PELA  
MONOCROTALINA EM MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Cristina Campos-Carraro - UFRGS

---

Dr. Luiz Carlos Kucharski - UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Belló-Klein – UFRGS

## AGRADECIMENTO

Agradecer é assumir que precisamos da ajuda de alguém e aceitar que o ser humano nunca é autossuficiente. Se cheguei a esse momento, foi porque eu recebi a ajuda de inúmeras pessoas, às quais tenho muito a agradecer.

Agradeço aos meus pais, **Cleci e Sonia**, que sempre estiveram caminhando comigo e deram-me toda a base que eu precisei para crescer e me tornar quem sou hoje. Não mediram esforços para me ajudar e sempre buscaram fazer o melhor, por mim, pelos meus irmãos ou por o que quer que fosse. Com certeza, são os melhores exemplos de amor, união e coragem que eu tenho e quero seguir.

Aos meus irmãos, **Vitor e Laura**, por toda a irmandade existente. São eles as maiores motivações que eu tenho para seguir em frente e buscar fazer tudo da melhor maneira possível, para que eu possa ser um importante referencial e bom exemplo de vida.

Gostaria de agradecer imensamente aos meus dindos, **Evandro e Edimara**, que me acolheram de braços, e coração, abertos em Porto Alegre e sempre foram muito presentes, e essenciais, durante esses 5 anos de graduação. Aos meus avôs, tanto os que já partiram, quanto a **Vó There** que ainda está aqui comigo, agradeço todo carinho dispensado. À toda minha família, minha eterna gratidão e amor.

Dedico especial agradecimento à minha orientadora, **Prof. Adriane Belló-Klein**, por toda atenção, ajuda e orientação fornecida. Agradeço pela disponibilidade de tempo e por confiar em mim, desde quando entrei no Laboratório, em julho de 2014, e no meu trabalho. À minha co-orientadora, que, além disso, é uma importante amiga, **Bruna**, sou muito grata por todo tempo dedicado a me ajudar. Foi de suma importância para a realização desse trabalho.

Aos demais professores do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, **Alex e Paulo**, agradeço pelas ideias e opiniões trocadas durante o trabalho; com certeza acrescentaram muito. Agradeço, também, a todos colegas do Laboratório, pois, cada um de sua maneira, contribuiu para que essa pesquisa fosse realizada. Ainda, tornaram o ambiente de trabalho muito mais alegre e acolhedor.

Em nome de minhas amigas de infância, **Bruna e Vanessa**, agradeço todos os meus amigos, sejam eles antigos, da faculdade ou recentes, que estiveram ao meu lado em importantes momentos dessa jornada, tornando tudo mais fácil e infinitas

vezes mais feliz. Obrigada por toda a compreensão, ajuda, apoio, incentivo e amizade. Cada um tem um espaço reservado em meu coração.

Agradeço, também, à banca examinadora, que aceitou de prontidão o convite e contribuiu com o aprimoramento do trabalho, e a todos os professores e funcionários da UFRGS que colaboraram para que eu chegasse à essa etapa da vida acadêmica.

Por fim, agradeço às entidades FAPERGS, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é definida pela elevação da pressão média da artéria pulmonar (PAPm) igual, ou superior, a 25 mmHg em repouso. É uma doença crônica e progressiva, marcada pelo remodelamento vascular e altos índices de morbidade e mortalidade. Ocorre de forma idiopática e é diagnosticada principalmente em pacientes em torno dos 50 anos de idade. Caracteriza-se pela anormalidade circulatória derivada do desequilíbrio de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e da proliferação de células musculares e endoteliais, o que resulta em lesões vaso-oclusivas. Ainda, a vasculatura pulmonar apresenta certo grau de disfunção endotelial, resultando em exacerbado tônus vasoconstritor. Essas alterações resultam no aumento da resistência vascular pulmonar, com elevação inapropriada dos níveis pressóricos. Para superar o aumento na pós-carga que é imposta, o ventrículo direito (VD) desenvolve uma hipertrofia concêntrica. No desenvolvimento da HAP, o estresse oxidativo desempenha importante papel, pois a acentuada produção de espécies reativas de oxigênio na vasculatura pulmonar está associada ao remodelamento e disfunção vascular. As alterações vistas na HAP causam, também, importantes alterações hemodinâmicas e funcionais no sistema cardiovascular. A administração de monocrotalina (MCT) gera mudanças estruturais e funcionais similares às dos pacientes com HAP, que se desenvolvem de acordo com a dose de MCT administrada e são tempo-dependentes. Visto que ainda são escassos estudos que apontem as principais alterações aos 7 e 14 dias de desenvolvimento da HAP, esse estudo teve como objetivo realizar uma análise tempo-dependente dos mecanismos de progressão da HAP, com base em alterações morfométricas, funcionais, de estado oxidativo e da regulação dos componentes do sistema nervoso autônomo (SNA). Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: controle 7 e 14 dias (CTR7 e CTR14); monocrotalina 7 e 14 dias (MCT7 e MCT14). Os grupos MCT7 e MCT14 receberam uma única injeção intraperitoneal de MCT (60 mg/Kg) e os grupos CTR7 e CTR14, o mesmo volume de solução salina. Ao final do protocolo, realizou-se o cateterismo do VD e artéria femoral e os animais foram decapitados. Após a morte, houve a retirada de órgãos para análises posteriores e a artéria pulmonar foi retirada e submetida ao teste de reatividade vascular. Os animais que receberam MCT (MCT7 e MCT14) apresentaram importantes diferenças morfométricas, em relação aos animais controle. A administração de MCT resultou na diminuição da reatividade da artéria pulmonar dos grupos MCT7 e MCT14, assim como no aumento da PAPm, na pressão sistólica do VD e na atividade da enzima NADPH oxidase no grupo MCT14. Não houve diferenças significativas na frequência cardíaca e nos parâmetros do SNA entre os quatro grupos. As alterações induzidas pela MCT envolvem, inicialmente, a responsividade e estrutura da vasculatura pulmonar, exigindo certas adaptações do VD, porém, grandes mudanças funcionais dessa câmara não são vistas nessa janela temporal, indicando que o VD ainda se encontra em estágio de hipertrofia compensatória e funcional. As principais alterações morfométricas, funcionais e hemodinâmicas estão mais evidentes a partir dos 14 dias após a aplicação da MCT, apesar de o quadro de HAP já estar bem estabelecido no sétimo.

Palavras-chave: Hipertensão arterial pulmonar. Monocrotalina. Reatividade vascular. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is defined by increase in mean pulmonary artery pressure (PAPm)  $\geq 25$ mmHg in rest. It's a chronic and progressive disease, marked by vascular remodeling and high rates of morbidity and mortality. It occurs idiopathically and is diagnosed mainly in patients around 50 years old. PAH is characterized by circulatory abnormality resultant from the imbalance between vasodilators and vasoconstrictors substances and the proliferation of muscular and endothelial cells, resulting in vaso-occlusive lesions. Moreover, the pulmonary vasculature shows some degree of endothelial dysfunction, which results in exacerbated vasoconstrictor tone. These changes cause increased pulmonary vascular resistance, with an inappropriate rise in pressure levels. To overcome the increased post-load imposed, the right ventricle (RV) develops a concentric hypertrophy. In PAH development, the oxidative stress plays an important role, because the reactive oxygen species production is associated with vascular remodeling and dysfunction. The changes seen in PAH also cause important hemodynamic and functional variations at cardiovascular system. Monocrotaline (MCT) administration generates structural and functional changes like those of PAH patients, which develops according to the MCT dose and are time-dependents. Since there are few studies that shows the major changes at 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of PAH development, the objective of this study was to accomplish a time-dependent PAH progression analysis, through morphometric, functional, oxidative state and autonomic nervous system (ANS) regulation changes. Male Wistar rats were divided into four groups: control 7 and 14 days (CTR7 and CTR14); monocrotaline 7 and 14 days (MCT7 and MCT14). The groups MCT7 and MCT14 received a single intraperitoneal injection of MCT (60 mg/Kg) and the groups CTR7 and CTR14, the same volume of saline. At the end of the protocol, the animals underwent RV and femoral catheterism and were decapitated. After this, some organs were collected for posterior analysis and the pulmonary artery were removed and submitted to vascular reactivity test. The animals that received MCT (MCT7 and MCT14) showed important morphometric differences in relation to control animals. MCT administration resulted in decreased pulmonary arterial reactivity in groups MCT7 and MCT14, as well increased PAPm, right ventricle systolic pressure and NADPH oxidase activity at group MCT14. There were no significant differences for heart rate and ANS parameters between the experimental groups. The changes induced by MCT involves, initially, the pulmonary vasculature responsiveness and structure, leading to some RV adaptations, but, large functional changes of this ventricle aren't present in this time window, indicating that the RV still is at compensatory hypertrophy stage and functional. The major morphometric, functional and hemodynamics changes are more evident at 14<sup>th</sup> day after MCT administration, although PAH is already well established in the 7<sup>th</sup> day.

Key words: Pulmonary arterial hypertension. Monocrotaline. Vascular reactivity. Oxidative stress.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formação de lesões plexiformes no lúmen vascular. Retirado e adaptado de Rabinovitch, M; 2008. ....20
- Figura 2.** Ventrículo direito em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar de acordo com a Lei de Laplace. Retirado e adaptado de Bogaard et al., 2009. ....22
- Figura 3.** A dilatação do ventrículo direito (RV) desloca o septo interventricular para a esquerda, mudando a geometria do ventrículo esquerdo (LV). Retirado e adaptado de Haddad et al., 2008. ....24
- Figura 4.** Conceito de estresse oxidativo baseado no desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Retirado e adaptado de Ferreira et al, 2007. ....27
- Figura 5.** Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na cadeia transportadora de elétrons. Retirado e adaptado de Ferreira et al., 2007. ....27
- Figura 6.** Foto da vagem, das sementes e das flores das espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*. Retirada e adaptada de Martinez et al., 2013. ....30
- Figuras do artigo científico
- Figura 7.** Análise temporal da massa corporal de ratos Wistar machos. ....43
- Figura 8.** Reatividade vascular da artéria pulmonar de ratos Wistar machos tratados com MCT (60 mg/Kg) ou salina. ....44
- Figura 9.** Imunoconteúdo do receptor A da endotelina (ET-A) em homogeneizado de artéria pulmonar de ratos Wistar machos. ....45
- Figura 10.** Imunoconteúdo da eNOS em homogeneizado de artéria pulmonar de ratos Wistar machos. ....46
- Figura 11.** Atividade da enzima NADPH oxidase em homogeneizado de artéria pulmonar de ratos Wistar machos. ....47
- Figura 12.** Análise da pressão da artéria pulmonar (PAP) em ratos Wistar machos. ....48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação atualizada da hipertensão pulmonar, segundo o 5º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar em Nice, França, em 2013. Fonte: Jardim; Prada; Souza (2015).....	15
Tabelas do artigo científico	
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros morfométricos (Índices de hipertrofia do ventrículo direito e índices de congestão pulmonar e hepática) de ratos Wistar machos.....	43
<b>Tabela 3.</b> IC50 e relaxamento máximo induzido pela acetilcolina em anéis de artéria pulmonar de ratos Wistar machos.....	44
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros hemodinâmicos (cateterismo do ventrículo direito e artéria femoral) de ratos Wistar machos.....	48
<b>Tabela 5.</b> Análise espectral no domínio da frequência. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo.....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>CAT</b>	catalase
<b>DC</b>	débito cardíaco
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dP/dt<sub>máxima</sub></b>	índice de contratilidade do ventrículo direito
<b>dP/dt<sub>mínima</sub></b>	índice de relaxamento do ventrículo direito
<b>eNOS</b>	óxido nítrico sintase endotelial
<b>EROs</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>ET-1</b>	endotelina-1
<b>ET-A</b>	receptor A da endotelina-1
<b>ET-B</b>	receptor B da endotelina-1
<b>FC</b>	frequência cardíaca
<b>FGF2</b>	fator de crescimento de fibroblasto 2
<b>GPx</b>	glutaciona peroxidase
<b>GSH</b>	glutaciona reduzida
<b>GSSG</b>	glutaciona oxidada
<b>HAP</b>	hipertensão arterial pulmonar
<b>HF</b>	componente de alta frequência (parassimpático)
<b>HP</b>	hipertensão pulmonar
<b>IC</b>	insuficiência cardíaca
<b>IPM</b>	índice de performance do miocárdio
<b>LF</b>	componente de baixa frequência (simpático)
<b>MCT</b>	monocrotalina
<b>mmHg</b>	milímetros de mercúrio
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>PAP</b>	pressão da artéria pulmonar
<b>PAPm</b>	pressão média da artéria pulmonar
<b>PCAP</b>	pressão de 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>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>TAPSE</b>	excursão sistólica do plano do anel da tricúspide
<b>VD</b>	ventrículo direito
<b>VE</b>	ventrículo esquerdo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA</b> .....	14
1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR .....	14
1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	16
1.2.1 Epidemiologia.....	17
1.2.2 Fisiopatologia .....	19
1.2.3 Características hemodinâmicas e funcionais .....	22
1.2.4 Hipertensão arterial pulmonar e sistema nervoso autônomo .....	24
1.2.5 Estresse Oxidativo .....	26
1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE HAP.....	29
1.4 JUSTIFICATIVA.....	32
1.5 OBJETIVOS .....	33
1.5.1 Objetivo Geral .....	33
1.5.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	34
<b>3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA</b> .....	79

# 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

## 1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR

A hipertensão pulmonar (HP) é uma comorbidade comum a diversas doenças cardíacas e pulmonares, nas quais a condição da vasculatura pulmonar é, geralmente, a principal determinante das manifestações clínicas, do curso clínico e do tratamento. Em indivíduos adultos, a HP é definida pela elevação da pressão média da artéria pulmonar (PAPm) igual, ou superior, a 25 mmHg, em condições de repouso e avaliada pelo cateterismo do ventrículo direito, padrão-ouro de diagnóstico em humanos (GALIÈ et al., 2009; MONTANI et al., 2013).

Por ser uma doença de variada etiologia, com poucos sintomas iniciais específicos, rápida evolução e mau prognóstico, a HP está relacionada a altas taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes (CHOUDHARY; JANKOWICH; WU, 2013). Apesar dos registros de incidência serem relativamente escassos, sabe-se que a HP não é uma doença muito rara, apresentando, no Reino Unido, uma incidência de 97 casos para um milhão de pessoas. Além disso, acomete com mais frequência pessoas do sexo feminino, em uma taxa de 1,8 mulheres para cada homem e a prevalência da doença é mais comum aos 35 anos de idade, porém, aumenta proporcionalmente à idade (CHOUDHARY; JANKOWICH; WU, 2013; GALIÈ et al., 2016). Devido à presença de mais fatores de risco e doenças contributivas, como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), esquistossomose e hepatites B e C, a incidência de HP em países da África é maior do que em países de alta renda e qualidade de vida (THIENEMANN et al., 2016).

O quadro clínico e as complicações apresentadas pelos pacientes com HP advêm de alterações na vasculatura pulmonar, as quais levam à redução progressiva do lúmen, resultando em um aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e consequente sobrecarga do ventrículo direito (VD) (HANDOKO et al., 2009; SIMONNEAU et al., 2013). Por conta do aumento do estresse imposto à parede do VD, há o desenvolvimento de hipertrofia compensatória, através da síntese proteica e adição de sarcômeros, fazendo com que a parede desta câmara fique mais espessa e suporte melhor as altas pressões a que é exposta (BOGAARD et al., 2009). Todavia,

esse efeito é transitório e, no processo final da HP, ocorre a disfunção e falência do VD (AUSTIN et al., 2013).

Dividida de acordo com as semelhanças patológicas, características hemodinâmicas e abordagens terapêuticas, a HP é classificada em 5 categorias, estabelecidas em 1998 e atualizadas, pela última vez, em 2013, durante o 5º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar. A atual classificação da HP está apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1. Classificação atualizada da hipertensão pulmonar, segundo o 5º Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar em Nice, França, em 2013. Fonte: Jardim; Prada; Souza (2015).**

**Quadro 1** – Classificação da hipertensão pulmonar (Nice, 2013).

---

<b>1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)</b>
1.1 HAP idiopática
1.2 HAP hereditária
1.2.1 BMPR2
1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.3 HAP induzida por drogas e toxinas
1.4 HAP associada
1.4.1 doenças do tecido conectivo
1.4.2 infecção por HIV
1.4.3 hipertensão portal
1.4.4 doença cardíaca congênita
1.4.5 esquistossomose

---

<b>1ª. Doença pulmonar veno-oclusiva e hemangiomatose capilar pulmonar</b>
<b>1ª. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido</b>
<b>2. Hipertensão pulmonar causada por doenças do coração esquerdo</b>
2.1 disfunção sistólica
2.2 disfunção diastólica
2.3 doença valvar
2.4 outras doenças congênitas que levam à disfunção cardíaca primária

---

<b>3. Hipertensão pulmonar causada por doença pulmonar e/ou hipóxia</b>
3.1 DPOC
3.2 doença intersticial pulmonar
3.3 outras doenças de padrão misto (restritivo e obstrutivo)
3.4 desordens respiratórias do sono
3.5 doenças que cursam com hipoventilação alveolar
3.6 exposição crônica a grandes altitudes
3.7 doenças do desenvolvimento pulmonar

---

<b>4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica</b>
<b>5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais ou não esclarecidos</b>
5.1 alterações hematológicas: anemias crônicas hemolíticas, doenças mieloproliferativas, esplenectomia
5.2 doenças sistêmicas: sarcoidose, histiocitose pulmonar, linfangioleiomiomatose
5.3 distúrbios metabólicos: tireoidopatias, doenças de depósito
5.4 outros: embolização tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica e hipertensão pulmonar segmentar

---

## 1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é o primeiro subgrupo da HP, composto por distúrbios com similar patologia na vasculatura pulmonar (AWDISH; CAJIGAS, 2016). Além de ser um dos grupos mais frequentes de HP, é uma doença devastadora e progressiva, caracterizada, principalmente, pelo remodelamento da vasculatura da circulação pulmonar (ZIMMER et al., 2017). A HAP é definida pela pressão de cunha da artéria pulmonar (PCAP) menor, ou igual, a 15 mmHg e RVP > 3 unidades Wood, sem a presença de outros fatores causadores de HP pré-capilar, como HP por conta de doenças pulmonares (AWDISH; CAJIGAS, 2016; GALIÈ et al., 2016).

Apesar de a etiologia exata ser desconhecida, sabe-se que a lesão vascular subjacente à HAP é determinada por susceptibilidades genéticas ou em associação com outros estados patológicos e é, provavelmente, uma resposta final a fatores ambientais (CHIN; RUBIN, 2008). O remodelamento das artérias e arteríolas pulmonares, em decorrência de mecanismos que envolvem vasoconstrição, resulta no aumento da RVP e da PAPm, acarretando em insuficiência ventricular direita progressiva e morte antecipada dos pacientes (BOGAARD et al., 2009; MALENFANT et al., 2013).

Anormalidades na troca gasosa e no fluxo sanguíneo são reconhecidas como fortes indícios de HAP, principalmente quando se manifestam durante a prática de exercícios físicos (GROEPENHOFF et al., 2013). Os sintomas da HAP são bastante inespecíficos, sendo que, na fase inicial da doença, os sintomas só são visíveis durante o esforço e se restringem à falta de ar, fadiga, fraqueza, angina e síncope. Casos menos frequentes apresentam, também, tosse seca, náuseas e vômitos (GALIÈ et al., 2016). Ademais, a funcionalidade do VD está intimamente relacionada com os sintomas apresentados pelos pacientes e o grau de severidade da doença, sendo a falência deste ventrículo a principal causa de óbitos entre os indivíduos acometidos pela HAP. Os principais parâmetros cardíacos associados com o prognóstico da doença são o tamanho das câmaras cardíacas diretas, índice de excentricidade do VE, alteração da frequência cardíaca (FC) e índice de *performance* do miocárdio (IPM) (HADDAD et al., 2008; VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011).

O diagnóstico correto, e antecipado, do subtipo de HAP em questão é de suma importância para um melhor desfecho e evolução do paciente, visto que as categorias



da doença são manejadas de maneiras diferentes entre si (HOEPER; GIBBS, 2014). O prognóstico dos pacientes tem melhorado nos últimos anos devido à disponibilidade de novas opções de tratamento (YILDIZ, 2009). Todavia, devido à inespecificidade dos sintomas, o diagnóstico da HAP frequentemente é realizado em fases avançadas, levando a uma limitada eficácia de interferências terapêuticas e reduzida expectativa de vida (HOEPER; GIBBS, 2014; PEACOCK et al., 2007).

As doenças pulmonares, tanto funcionais, quanto estruturais, que geram implicações patológicas no VD caracterizam o quadro denominado *Cor Pulmonale*. Como a HAP causa modificações na vasculatura pulmonar que acarretam no remodelamento e falência do VD, é classificada como um mecanismo patológico subjacente ao *Cor Pulmonale* (SHUJAAT; MINKIN; EDEN, 2007).

### **1.2.1 Epidemiologia**

A HAP é uma doença rara, com prevalência de 15 casos por milhão de habitantes e, a cada ano, 24 novos casos de HAP são registrados dentre um milhão de adultos (GALIÈ et al., 2016; KIELY et al., 2013). Dados da Escócia mostram que a prevalência da doença no país é um pouco superior que a média mundial, sendo de 25 casos por milhão de habitantes adultos (AWDISH; CAJIGAS, 2016). O acometimento dessa doença em crianças é pouco registrado, mas os dados existentes caracterizam os pacientes como meninos menores de dois anos de idade. As taxas de incidência e prevalência nos Estados Unidos são, respectivamente, 5 – 8 casos por ano e 26 – 33 casos, por milhão de crianças. Porém, dados europeus apresentam menores índices de incidência e prevalência da HAP em crianças, o que demonstra a necessidade do aprimoramento desses registros (LI et al., 2017).

O primeiro estudo prospectivo da HAP descrito foi realizado nos anos 80, através da análise de 187 pacientes pelo National Institute of Health dos Estados Unidos (US-NIH). As mulheres eram afetadas em maior frequência, na proporção de 1,7 mulheres para cada homem, e a maioria dos pacientes eram adultos jovens, com idade média de 36 anos (AWDISH; CAJIGAS, 2016; MONTANI et al., 2013). Atualmente, a HAP é mais diagnosticada em pacientes mais velhos, em torno dos 50 anos de idade, esse fato pode ser consequência de maior consciência sobre a doença e rastreamento dos sinais/sintomas iniciais (AWDISH; CAJIGAS, 2016; GALIÈ et al., 2016). Além disso, a

predominância de mulheres depende de inúmeros fatores, como espaço geográfico analisado, idade dos pacientes e fator etiológico da HAP. Em pacientes mais jovens, a proporção entre mulheres e homens afetados é de 2,3:1 e, em pacientes idosos, não há diferença de acometimento (GALIÈ et al., 2016; HOEPER; GIBBS, 2014). No Brasil, o diagnóstico da HAP é feito, geralmente, aos 39 anos de idade e, para cada homem diagnosticado, há 3,3 mulheres atingidas pela doença (ALVES et al., 2015).

O tempo decorrido entre o início dos sintomas até o momento do diagnóstico é, normalmente, de 2 anos (AWDISH; CAJIGAS, 2016; HOEPER; GIBBS, 2014). No Brasil, apesar da precária infraestrutura do sistema de saúde, o diagnóstico é determinado dentro de 20 meses após os sintomas iniciais; não havendo, portanto, retardo no diagnóstico de pacientes brasileiros em relação a pacientes tratados em centros de referência de países desenvolvidos (LAPA, 2006). Após o diagnóstico, o prognóstico dos pacientes e a taxa de sobrevida ainda são insatisfatórios, apesar do desenvolvimento de novas terapêuticas e do maior entendimento da patofisiologia da HAP (MONTANI et al., 2013). Pacientes que não são tratados apresentam uma taxa de sobrevida de 2,8 anos, sobrevivência de 48% após 3 anos do diagnóstico, enquanto que os pacientes que recebem o tratamento adequado têm uma sobrevida de 7 anos (AWDISH; CAJIGAS, 2016; KIELY et al., 2013; MCGOON et al., 2013; MONTANI et al., 2013). Contudo, a taxa de sobrevivência varia entre pacientes com diferentes idades, sendo que, pacientes mais idosos são diagnosticados com graus mais severos da doença e possuem menor expectativa de vida, após o diagnóstico, que pacientes jovens (HOEPER; GIBBS, 2014; LING et al., 2012).

O registro de dados dos pacientes é de suma importância para o entendimento da história da HAP, da evolução da doença e de características peculiares de cada país ou região. Isto porque há grandes diferenças na etiologia da doença entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos, o que requer o desenvolvimento de tratamentos adequados para cada momento e situação (ALVES et al., 2015; AWDISH; CAJIGAS, 2016; LAPA, 2006). Atualmente, existem 11 registros internacionais que apresentam os dados de 6 países (Estados Unidos, Escócia, França, China, Reino Unido e Espanha) e, em todos, eles, com exceção dos registros chineses, a etiologia predominante da HAP é a desconhecida, ou seja, a HAP idiopática é o subgrupo mais frequente da HAP (AWDISH; CAJIGAS, 2016). Seguindo a HAP idiopática, a HAP por doenças do tecido conjuntivo é a segunda principal causa de HAP. A terceira principal

etiologia é variável, sendo que na maioria dos países doenças congênitas do coração assumem essa posição. No Brasil, entretanto, assim como em vários países africanos, a esquistossomose aparece como importante causadora de HAP (ALVES et al., 2015; HOEPER; GIBBS, 2014; THIENEMANN et al., 2016). Apesar de não ser a forma mais comum, a HAP associada a doenças do tecido conjuntivo apresenta o pior prognóstico aos pacientes (ALVES et al., 2015; HOEPER; GIBBS, 2014).

Doenças endêmicas, como HIV e esquistossomose, características de países subdesenvolvidos e com saneamento básico insatisfatório, acabam atuando como fatores predisponentes para o desenvolvimento da HAP e, também, aumentam o desafio para o estabelecimento de abordagens terapêuticas que sejam, de fato, eficazes (ALVES et al., 2015; KIELY et al., 2013; THIENEMANN et al., 2016). Além de doenças concomitantes, a presença de comorbidades nos pacientes aumenta a prevalência de HAP, bem como tem grande efeito no prognóstico dos pacientes. As principais comorbidades que interferem no desenvolvimento ou no curso da HAP são obesidade, diabetes, pressão sistêmica elevada, valvopatia mitral e doença pulmonar crônica (ALVES et al., 2015; KIELY et al., 2013).

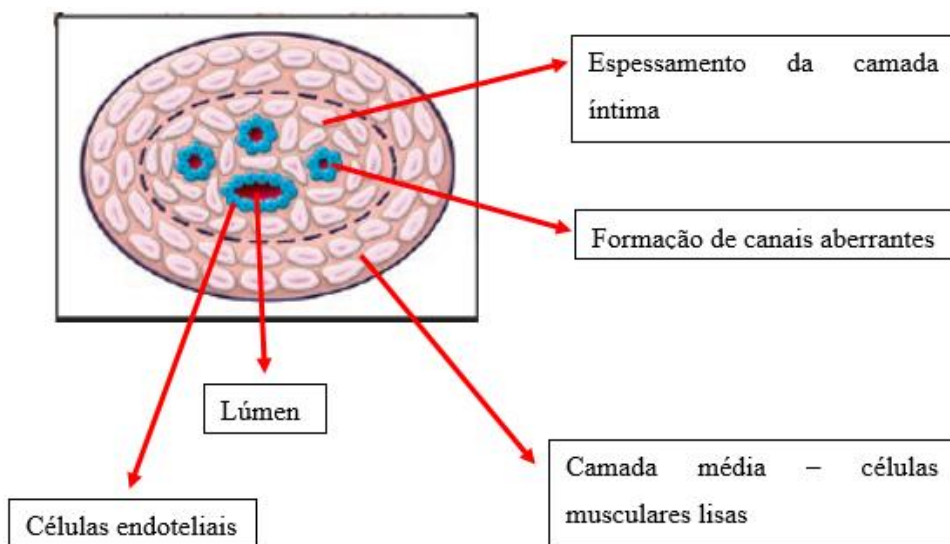
### **1.2.2 Fisiopatologia**

A HAP é resultante, basicamente, de três anormalidades vasculares: remodelamento vascular; trombose e vasoconstrição. Por ser um leito vascular de baixa pressão, baixa resistência (apresentando baixo tônus vascular de repouso) e altamente distensível, a circulação pulmonar é capaz de acomodar e reger com facilidade, e sem elevar expressivamente a pressão da artéria pulmonar (PAP), aumentos de fluxo sanguíneo local (CHEMLA et al., 2002).

O remodelamento da vasculatura pulmonar é o principal determinante de um quadro típico de HAP. Seu desenvolvimento é processo multi-fatorial e multi-celular, dependente de fatores de crescimento, substâncias vasoativas e forças hemodinâmicas, que resulta em uma alteração do lúmen das artérias e arteríolas pulmonares por conta da hiperplasia e proliferação das células musculares lisas, acarretando o espessamento da camada média vascular (AGGARWAL et al., 2013; BOGDAN et al., 2012).

Entretanto, estudos mostram que o desenvolvimento das alterações vasculares ocorre, apenas, após o 14<sup>o</sup> dia de indução da HAP, pois, nos primeiros 14 dias, há inflamação na região vascular, perivascular e alveolar, com infiltrado linfo-monocitário e edema, a qual regride progressivamente e, então, ocorre o remodelamento dos vasos. Contudo, a inflamação inicial é de suma importância para o desenvolvimento do quadro, uma vez que as citocinas inflamatórias também agem como estímulos para o remodelamento vascular (AGGARWAL et al., 2013; BOGDAN et al., 2012; SHUJAAT; MINKIN; EDEN, 2007).

Além do aumento da camada média, a proliferação das células endoteliais, alterações na camada adventícia e a formação da neointima, uma camada formada por miofibroblastos entre a camada íntima e a lâmina elástica interna, contribuem para o remodelamento da vasculatura pulmonar e, conseqüente, aumento da RVP (AGGARWAL et al., 2013; RABINOVITCH, 2008). As células endoteliais, em resposta a fatores de crescimento, se proliferam de maneira descontrolada durante a HAP, resultando no espessamento da camada íntima vascular. Nos estágios finais da doença, há formação de lesões plexiformes, as quais são definidas pela formação de canais aberrantes, que se assemelham com capilares, formando um plexo no lúmen vascular, que está obstruído devido ao remodelamento (Figura 1) (RABINOVITCH, 2008).



**Figura 1. Formação de canais aberrantes no lúmen vascular. Retirado e adaptado de Rabinovitch, M; 2008.**

Ainda, as células endoteliais contribuem para a muscularização das artérias e arteríolas pulmonares na HAP pois diminuem a síntese de óxido nítrico (NO), que é um importante inibidor de proliferação de células musculares lisas, e liberam o fator de crescimento de fibroblastos – 2 (FGF2), que age opostamente ao NO, estimulando a muscularização dos vasos (AGGARWAL et al., 2013; RABINOVITCH, 2008).

A camada adventícia também é remodelada, mas, sua principal contribuição para o desenvolvimento da HAP é através da modulação que os fibroblastos exercem sobre as células musculares lisas da camada média e da diferenciação dos fibroblastos, em miofibroblastos, para promover a muscularização de capilares (AGGARWAL et al., 2013).

Em consequência destas alterações estruturais no leito vascular pulmonar, o lúmen dos vasos é, significativamente, reduzido e há um aumento da RVP. Somando-se a isso, o desequilíbrio entre substâncias vasoconstritoras (como endotelina-1 e tromboxano) e vasodilatadoras (como NO e prostaciclina) colabora para a elevação da RVP (VAILLANCOURT et al., 2015). A elevada RVP é a responsável pelo aumento da PAP, sinal clássico da HAP.

Sendo que o VD ejeta diretamente na artéria pulmonar, a elevação da PAP acarreta em um aumento de trabalho imposto a essa câmara, visto que é preciso superar pressões maiores que o normal para ejetar a mesma quantidade de sangue. O VD apresenta um formato diferente do ventrículo esquerdo (VE), com paredes mais finas e formato decrescente, reflexo da baixa pressão característica da circulação pulmonar e o que lhe garante maior complacência (BOGAARD et al., 2009; VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011).

A relação pressão-volume existente no VD permite a adaptação ao aumento da carga imposta a esta câmara cardíaca. Na HAP, o mecanismo utilizado pelo VD para compensar o aumento da pós-carga, devido ao aumento da PAP, é o desenvolvimento de hipertrofia concêntrica. Através da síntese proteica e adição de sarcômeros, o VD aumenta a espessura da parede e assume uma forma mais arredondada (Figura 2) (BOGAARD et al., 2009; HESSEL et al., 2006; VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011). A síntese proteica é estimulada, principalmente, pela detecção do estiramento pelas integrinas. As integrinas são proteínas transmembrana associadas tanto à matriz extracelular, quanto ao citoesqueleto, o que as permite a transdução do

estresse mecânico externo em sinalização química intracelular, a qual é responsável pela estimulação da síntese de proteínas contráteis (BOGAARD et al., 2009).

Entretanto, o VD não consegue, mesmo com a hipertrofia compensatória, manter a função perante uma sobrecarga de pressão sustentada (VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011). Devido a alterações estruturais e bioquímicas nos cardiomiócitos, o VD passa para um estado dilatado, piorando sua função sistólica e diastólica (HADDAD et al., 2008; HESSEL et al., 2006).

A evolução do estágio hipertrofiado do VD para o estágio dilatado ainda não está bem elucidada, mas, dentre os mecanismos que induzem essa progressão, estão aqueles que se relacionam a modificações nas proteínas contráteis do miocárdio, assim como hiperativação neuro-hormonal, estresse oxidativo e nitrosativo, ativação do sistema imune, expressão de determinados genes e apoptose (BOGAARD et al., 2009; HESSEL et al., 2006).

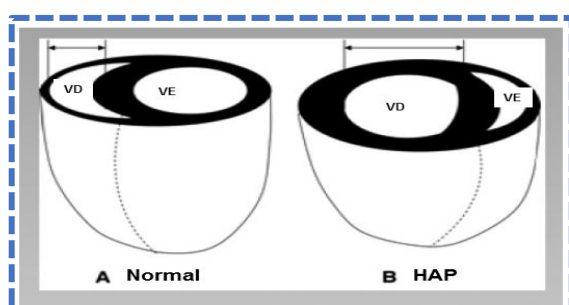


Figura 2. Ventrículo direito em uma situação normal e na hipertensão arterial pulmonar de acordo com a Lei de Laplace. Retirado e adaptado de Bogaard et al, (2009).

### 1.2.3 Características hemodinâmicas e funcionais

Apesar de a HAP ser principalmente caracterizada pelo aumento da RVP, a severidade dos sintomas, assim como os altos índices de morbidade e mortalidade da doença, está extremamente associada aos danos causados ao VD, sendo a insuficiência cardíaca (IC) direita a principal causa de morte destes pacientes. Parâmetros morfológicos e funcionais do VD, como débito cardíaco (DC), diâmetro do VD e excursão sistólica do plano do anel da tricúspide (TAPSE), têm sido identificados e associados com o prognóstico da HAP (VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011).

Estudos indicam que a espessura da parede livre do VD aumenta de acordo com o grau de pós-carga que é imposta a essa câmara. Comparando animais com HAP

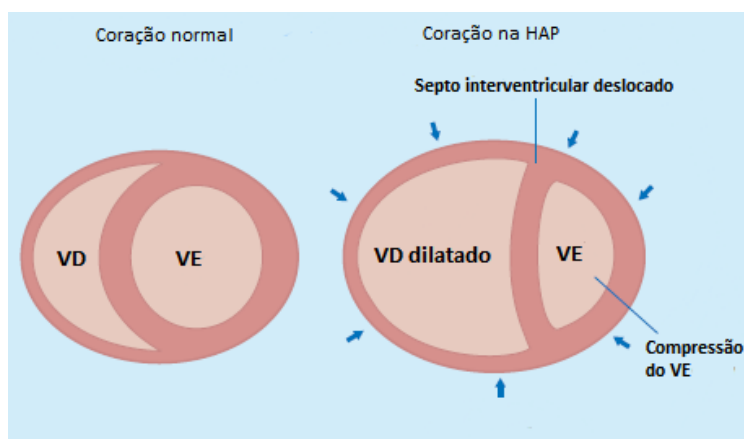
com animais normais, a taxa de hipertrofia do VD nos animais doentes chega a ser 3 vezes maior (FARAHMAND et al., 2004). Além disso, a evolução do quadro hipertrófico para a dilatação da câmara direita resulta no deslocamento do septo interventricular em direção ao ventrículo esquerdo, ocasionando a diminuição de seu diâmetro e alteração de sua forma (Figura 3) (HADDAD et al., 2008; KINGMA; TYBERG; SMITH, 1983). O remodelamento do septo interventricular é altamente relacionado à elevada pressão diastólica final do VD (PDFVD) vista na HAP (FARAHMAND et al., 2004).

Entre as principais alterações hemodinâmicas e funcionais estão o aumento da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e PAPm, visto que a hipertrofia da camada muscular das artérias e arteríolas pulmonares aumenta a RVP e, conseqüentemente, a pressão exercida pelo VD (LUDKE et al., 2010). Também são encontrados na HAP a redução do DC e da fração de ejeção do VD, associada ao aumento do volume diastólico final devido à dilatação desenvolvida no VD, e alteração na TAPSE (HESSEL et al., 2006; VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011). Lima e colaboradores (2017), em recente estudo utilizando ratos Wistar após 21 dias da indução da HAP por monocrotalina, demonstraram aumento da PAPm, aumento na pressão sistólica e diastólica do VD e aumento dos índices de contratilidade e relaxamento, tornando maior o esforço do miocárdio para exercer sua função de bomba, representado pelo maior valor de IPM nos animais doentes.

A HAP tem como sinal clássico a congestão pulmonar, cujas principais características são a alveolite fibrosante difusa, o espessamento de septos interalveolares, edema e infiltrado inflamatório mononuclear e, principalmente, macrófagos espumosos (GARDINER; ROYCE; BOKOR, 1965; NOBRE; DAGLI; HARAGUCHI, 1994). Esse estado inflamatório, semelhante a um processo de pneumonia aguda, ocorre durante os primeiros 14 dias após a indução da doença, sendo posteriormente substituído pelo desenvolvimento de fibrose intersticial (BOGDAN et al., 2012).

É sabido que a administração de MCT em ratos está associada com o aumento da reatividade da artéria pulmonar, além do significativo remodelamento arteriolar pulmonar descrita anteriormente (ZAPATA-SUDO et al., 2012). Além do desequilíbrio entre substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, a vasculatura pulmonar apresenta certo grau de disfunção endotelial, resultando em um exacerbado tônus

vasoconstritor. A vasoconstrição sustentada da vasculatura pulmonar é a responsável pela elevação da PAP, a qual desencadeia a sucessão de eventos até o desfecho final da HAP (ALENCAR et al., 2013).



**Figura 3.** A dilatação do ventrículo direito (VD) desloca o septo interventricular para a esquerda, mudando a geometria do ventrículo esquerdo (VE). Retirado e adaptado de Haddad et al, (2008).

#### 1.2.4 Hipertensão arterial pulmonar e sistema nervoso autônomo

O sistema nervoso autônomo (SNA), através da ação da noradrenalina e da acetilcolina, secretadas, respectivamente, pelo sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP), afeta a funcionalidade do sistema cardiovascular. A ação desses neurotransmissores altera, principalmente, a força de contração dos cardiomiócitos e a frequência cardíaca (DE ANGELIS; SANTOS; IRIGOYEN, 2004).

O SNS, mediante ativação dos receptores adrenérgicos pela noradrenalina e/ou adrenalina, acelera a frequência cardíaca, aumenta a força de contração das fibras musculares cardíacas (efeito inotrópico positivo), aumenta a taxa de relaxamento do miocárdio (efeito lusitrópico positivo), a condução do impulso (efeito dromotrópico positivo) através, especialmente, do nodo sinoatrial (efeito cronotrópico positivo) e a constrição de arteríolas (CIARKA et al., 2007; HADDAD et al., 2008; TRIPOSKIADIS et al., 2009). Por outro lado, os impulsos vagais e a liberação de acetilcolina, resultantes da ativação do SNP, diminuem a frequência cardíaca, mas exercem poucos efeitos na contratilidade cardíaca (TRIPOSKIADIS et al., 2009).



O SNS é o principal componente autonômico dos ventrículos, posto que as fibras simpáticas acompanham as principais artérias coronárias (TRIPOSKIADIS et al., 2009). Devido à diminuição do débito cardíaco na HAP, ocorre a redução da perfusão tecidual e consequente ativação das vias neuro-hormonais simpáticas (BOGAARD et al., 2009). Além disso, a estimulação do SNS também pode ser resultado do aumento da pós-carga imposta aos ventrículos (ANDERSEN et al., 2015). A ativação do SNS é o melhor mecanismo fisiológico para elevar, de maneira aguda, a performance do miocárdio e manter, ou reestabelecer, a homeostase cardiovascular (TRIPOSKIADIS et al., 2009). A ativação aguda do SNS é uma resposta adaptativa do sistema cardiovascular para compensar a função miocárdica prejudicada e, deste modo, manter os níveis adequados de pressão e de débito cardíaco (DE LIMA-SEOLIN et al., 2017; TRIPOSKIADIS et al., 2009). Todavia, a hiperativação sustentada do SNS acarreta efeitos deletérios na estrutura e no desempenho cardíaco (BOGAARD et al., 2009; TRIPOSKIADIS et al., 2009).

Estudos demonstram que, na HAP, há um desequilíbrio do SNA, caracterizado pela elevação da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática simultaneamente (DE LIMA-SEOLIN et al., 2017). Desta forma, a hiperatividade do SNS vista em pacientes com HAP é um importante fator patofisiológico, uma vez que acelera a progressão da doença através da estimulação da síntese de proteínas nos cardiomiócitos e do remodelamento cardíaco (ANDERSEN et al., 2015; BOGAARD et al., 2009). Esses fatores, em conjunto, promovem a falência do VD, principal causa de óbitos dentre as pessoas acometidas pela HAP (TRIPOSKIADIS et al., 2009). Logo, pode-se dizer que a HAP é resultado da interação entre a disfunção miocárdica e a ativação, compensatória, neuro-hormonal, sendo o distúrbio do SNA um dos principais fatores relacionados à patogênese dessa doença (RIGATTO et al., 2013; TRIPOSKIADIS et al., 2009).

Além dos efeitos diretos no coração, a hiperatividade simpática pode ser prejudicial para a vasculatura pulmonar, uma vez que esses vasos são altamente inervados por fibras simpáticas, induzindo a constrição dessa vasculatura [e.1; gg]. De certa forma, os danos no leito vascular pulmonar fomentam o remodelamento e falência ocorridos no VD (BOGAARD et al., 2009; CIARKA et al., 2007).

Por conta da ativação crônica do SNS, pacientes com HAP apresentam altos níveis de catecolaminas plasmáticas, e, apesar de ocorrer uma *downregulation* dos

receptores beta-adrenérgicos, principalmente do tipo beta-1, como forma de adaptação protetora aos altos níveis de noradrenalina e adrenalina, há um efeito tóxico dessas substâncias sobre os cardiomiócitos (ANDERSEN et al., 2015; TRIPOSKIADIS et al., 2009). A liberação exacerbada de catecolaminas é capaz de estimular a fibrose intersticial, a redução da resposta inotrópica positiva e a dilatação cardíaca, através de danos oxidativos (resultantes da autooxidação) e da ativação de vias apoptóticas (TRIPOSKIADIS et al., 2009; VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011). O aumento de catecolaminas circulantes é responsável por importantes efeitos cardiotoxicos e induz necrose dos cardiomiócitos (DE LIMA-SEOLIN et al., 2017).

### **1.2.5 Estresse Oxidativo**

Radicais livres (RL) é a definição dada a um grupo de substâncias químicas, sendo átomos ou moléculas, que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados nos seus orbitais mais externos (FERREIRA; FERREIRA; DUARTE, 2007; SINGAL et al., 2000). A presença de elétrons desemparelhados confere aos RL uma alta capacidade reativa e instabilidade química, sendo que a estabilidade desses compostos somente é alcançada quando ocorre reações de oxidação ou redução com outras moléculas (FERREIRA; FERREIRA; DUARTE, 2007). Os RL são formados a partir do metabolismo basal das células, através da adição ou remoção sequencial de elétrons, e têm as mitocôndrias como principal fonte formadora (SILVA; FERRARI, 2011; SINGAL et al., 2000). Na HAP, há um aumento na produção de RL, resultando em elevado estresse oxidativo (LAI et al., 2014).

Estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes, como RL, e as defesas antioxidantes do organismo, com prevalência dos primeiros (Figura 4), tanto por causa do aumento da produção dessas substâncias quanto pela diminuição da capacidade de defesa, ou seja, nessas condições, a capacidade do organismo de neutralizar os efeitos dessas moléculas está prejudicada (AGGARWAL et al., 2013; FARAHMAND et al., 2004; HALLIWELL, 2007; SIES, 1997; SINGAL et al., 2000).

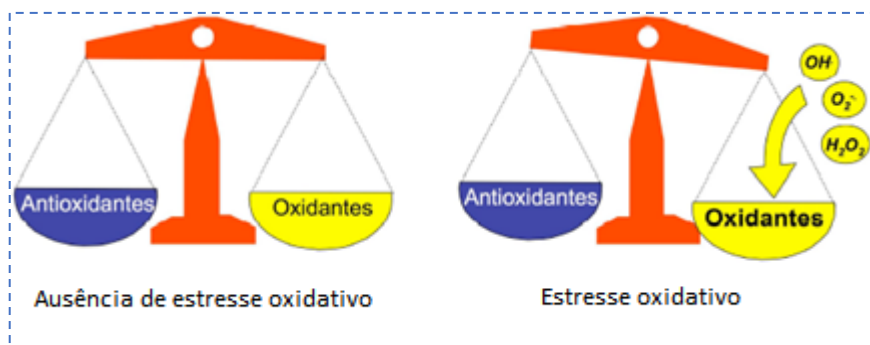


Figura 4. Conceito de estresse oxidativo baseado no desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Retirado e adaptado de Ferreira et al, 2007.

A terminologia espécies reativas de oxigênio (EROs) designa espécies que são formadas, naturalmente, como bioprodutos da redução do oxigênio. Dentre as EROs, destacam-se o radical hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), oxigênio singlet ( $^1\text{O}_2$ ), radical peróxil ( $\text{RO}_2\cdot$ ) e espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (AGGARWAL et al., 2013). Cada uma dessas moléculas apresenta características, poder de reatividade e tempo de meia-vida específicos (YU, 1994). O oxigênio molecular, por apresentar dois elétrons desemparelhados de spins paralelos no orbital mais externo, tende a captar elétrons de outras moléculas (AGGARWAL et al., 2013). A redução monovalente do oxigênio, ou seja, a captação de um elétron por reação em reações sequenciais, gera as EROs, como demonstrado na Figura 5.

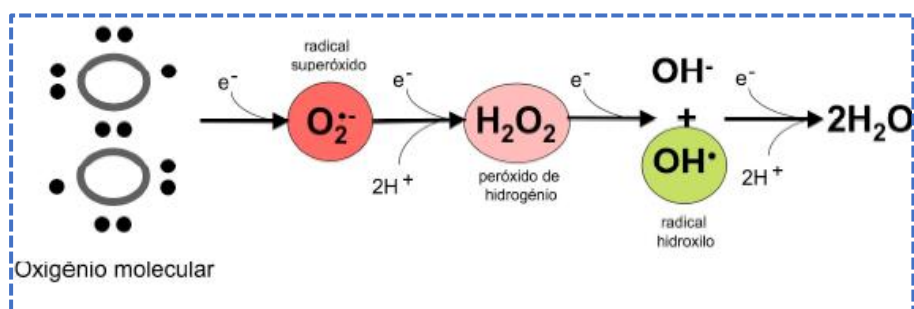


Figura 5. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) na cadeia transportadora de elétrons. Retirado e adaptado de Ferreira et al, (2007).

Em baixas concentrações, as EROs agem como moléculas sinalizadoras e mensageiros secundários em algumas rotas metabólicas celulares, atuando principalmente na sinalização celular, expressão de determinados genes e reação inflamatória (AGGARWAL et al., 2013; FERREIRA; FERREIRA; DUARTE, 2007). Entretanto, em situação de estresse oxidativo, os altos níveis dessas moléculas

acabam sendo prejudiciais às células devido às interações deletérias das EROs com lipídeos de membrana, proteínas e moléculas de DNA (AGGARWAL et al., 2013; DEATON; MARLIN, 2003; SINGAL et al., 2000). A interação de EROs com os lipídeos de membranas celulares e subcelulares, processo denominado de lipoperoxidação, ocorre, principalmente, através do radical hidroxil e causa importante alteração na estrutura e função da membrana, podendo resultar em morte e disfunção celular (FERREIRA; FERREIRA; DUARTE, 2007; SINGAL et al., 2000). Além disso, quando as EROs interagem com proteínas, transformam-nas em proteínas oxidadas, por alterarem sua estrutura e função (REZNICK; PACKER, 1994; SINGAL et al., 2000). A perda funcional de proteínas contráteis do miocárdio, por conta do estresse oxidativo, é um fator patofisiológico bastante importante para o desenvolvimento da IC na HAP (BOGAARD et al., 2009; FARAHMAND et al., 2004). Nos ácidos nucleicos, o principal dano causado pelo estresse oxidativo é a quebra de fita simples de DNA e aberrações cromossômicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SINGAL et al., 2000).

O organismo, a fim de minimizar, ou até mesmo inibir, os efeitos deletérios das ações das EROs e dos radicais livres, possui um sistema de defesa antioxidante bastante eficiente em condições fisiológicas (SINGAL et al., 2000). Antioxidantes são definidos como qualquer substância que atrasa significativamente, ou impede, os danos oxidativos causados a uma molécula – alvo. Os antioxidantes podem ser produzidos endogenamente ou, também, adquiridos através da dieta e/ ou suplementação (HALLIWELL, 2007). A defesa antioxidante endógena é feita por duas classes de moléculas antioxidantes: enzimáticas e não – enzimáticas. Dentre os antioxidantes não – enzimáticos, destaca-se a atividade do alfa-tocoferol, principal representante da vitamina E, pela intensa proteção às membranas celulares, porém, a ação sinérgica do alfa-tocoferol e do ácido ascórbico também merece destaque no sistema de proteção não – enzimático (SINGAL et al., 2000).

As reservas antioxidantes enzimáticas são compostas, essencialmente, pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) (MCCORD; FRIDOVICH, 1969). A SOD é a primeira linha de defesa contra radicais livres, ela atua dismutando o ânion superóxido em uma espécie não – radicalar, o peróxido de hidrogênio (MURPHY et al., 2011; SINGAL et al., 2000). O peróxido de hidrogênio resultante da ação da SOD pode reagir com metais de transição que se encontram na forma livre ( $Fe^{+2}$  e  $Cu^{+}$ ) e formar o radical hidroxil, a ERO mais reativa

às biomoléculas próximas. Entretanto, o peróxido de hidrogênio pode ser eliminado na forma de água e oxigênio pela ação de duas enzimas antioxidantes, a CAT e a GPx (FERREIRA; FERREIRA; DUARTE, 2007). A principal diferença entre elas é a maior efetividade da GPx em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio e, também por parte da GPx, a utilização da glutathiona reduzida (GSH) como substrato, convertendo-a à forma oxidada (GSSG) (BISWAS; RAHMAN, 2009; SINGAL et al., 2000). Essa dupla ação enzimática sobre o peróxido de hidrogênio garante que a produção de radical hidroxil seja mínima, visto que é uma ERO bastante danosa. No coração, a GPx desempenha importante papel na defesa antioxidante (SINGAL et al., 2000).

É sabido que a exacerbada produção de EROs na vasculatura pulmonar está associada ao remodelamento e disfunção vascular, visto que modulam a liberação, ou atividade, de diversas substâncias vasoativas que afetam o tônus vascular e fatores que influenciam na espessura da parede dos vasos (AGGARWAL et al., 2013). A atividade de muitas enzimas também é responsável pela produção de espécies reativas na vasculatura pulmonar, dentre elas, destaca-se a eNOS e a NADPH oxidase. A primeira, responsável pela síntese do NO, começa a produzir  $O_2^{\cdot-}$  quando os cofatores utilizados (L-arginina e tetrahidrobiopterina) estão escassos. Por outro lado, a função primária da NADPH oxidase é a produção de  $O_2^{\cdot-}$  por catalizar a redução de um elétron do oxigênio molecular, a partir de NADPH (AGGARWAL et al., 2013).

Ademais, as EROs são capazes de induzir o remodelamento cardíaco por inativarem enzimas envolvidas no acoplamento de excitação-contração muscular, indução de dano celular, inflamação e apoptose (BOGAARD et al., 2009). Por conta dessas alterações induzidas pelas EROs, o elevado estresse oxidativo está intimamente associado com a patogênese da HAP e IC (KHAPER et al., 2010; LUDKE et al., 2010).

### 1.3 MODELO EXPERIMENTAL DE HAP

A administração de monocrotalina (MCT) em ratos tem sido o principal modelo utilizado para explorar os mecanismos envolvidos na HAP e sua resultante disfunção

cardíaca (ITO et al., 2000). A MCT é um alcaloide inativo derivado de sementes de plantas do gênero *Crotalaria* e, após passar pelo metabolismo hepático e sofrer oxidação em sua molécula, gera o seu metabólito pirrolizidínico ativo, a dehidromonocrotalina, que desencadeia alterações estruturais e funcionais nos pulmões e na vascularização pulmonar (DAICHO et al., 2009; FARHAT et al., 1993; POLONIO et al., 2012). Acredita-se que a vasculatura pulmonar seja o principal alvo da MCT devido à proximidade anátomo-circulatória do fígado e do pulmão e pela presença de proteínas específicas de células endoteliais pulmonares que são alvos de ligação da MCT (BOGDAN et al., 2012). O gênero *Crotalaria* pertence à família das leguminosas (Figura 6) e revelam-se como plantas herbáceas com cerca de 50 cm ou arbustos com até 3 metros (FLORES; MIOTTO, 2005). No Brasil, há cerca de 40 espécies crescendo abundantemente, principalmente em plantações de grãos e em pastagens, uma vez que são caracterizadas como plantas invasoras (PALOMINO; VÁZQUEZ, 1991; TOKARNIA; BRITO; BARBOSA, 2012). O nome desta planta se deve ao som que as suas vagens secas emitem, quando tocadas, que lembra o som da cauda da cascavel, cujo gênero é *Crotalus* (WILLIAMS; MOLYNEUX, 1987).



**Figura 6. Foto da vagem, das sementes e das flores das espécies pertencentes ao gênero *Crotalaria*. Retirada e adaptada de Martinez; Dos Santos; Pinto, (2013).**

O mecanismo de ação da MCT ainda é desconhecido, mas sabe-se que os eritrócitos estão altamente envolvidos no transporte da dehidromonocrotalina do fígado até os pulmões (PAN, 1991). Nas arteríolas e artérias pulmonares, através do desencadeamento de uma resposta inflamatória com resposta hipertrófica e hiperplásica das células musculares lisas, desequilíbrio entre substâncias

vasodilatadoras e vasoconstritoras e elevação da pressão arterial pulmonar, a dehidromonocrotalina leva ao surgimento progressivo de HAP severa e irreversível (GOMEZ-ARROYO et al., 2012; MEYRICK; GAMBLE; REID, 1980).

O modelo mais utilizado para mimetizar a HAP consiste na administração de MCT, no qual alterações cardiovasculares e pulmonares são similares às dos pacientes com HAP (POLONIO et al., 2012; SOUZA-RABBO et al., 2008; YEE et al., 2000). A hipertrofia ventricular direita causada pela dehidromonocrotalina é estabelecida dentro de 2 a 3 semanas após a administração da droga (ITO et al., 2000). Ao investigar a progressão da HAP em decorrência da administração de MCT em ratos Wistar, Leichsenring-Silva et al. (2011) observaram modificações morfológicas e funcionais do VD aos 21 dias após a injeção de MCT. Após 31 dias do início do protocolo, foram encontradas mudanças no ventrículo esquerdo, sugerindo subsequente disfunção desta câmara.

Buermans et al. (2005) demonstraram que, após 4 semanas da administração de uma alta dose de monocrotalina (80 mg/Kg), houve progressão para insuficiência cardíaca congestiva em todos os animais submetidos ao tratamento, enquanto a administração de uma baixa dose de monocrotalina (30 mg/Kg) causou apenas a hipertrofia do VD, no mesmo período.

Leichsenring-Silva (2011) demonstrou a progressiva repercussão da HAP induzida pela monocrotalina sobre os pulmões, através de histologia, aos 7 e 21 dias após aplicação da droga. Não foram encontradas alterações estruturais nos alvéolos aos 7 dias, apenas um pequeno infiltrado inflamatório. Já, aos 21 dias, houve espessamento do septo alveolar com aumento no número de células inflamatórias, indicando o desenvolvimento de congestão pulmonar. Também demonstrou a condição funcional do coração aos 7, 21 e 31 dias após a indução de HAP por monocrotalina. Dentre os resultados, aos 7 dias foi evidenciado apenas o aumento da resistência vascular pulmonar, aos 21, aumento na razão peso do VD pelo peso corporal, indicando desenvolvimento da hipertrofia, além da congestão pulmonar e aos 31 dias o ventrículo esquerdo já apresentava disfunção sistólica e diastólica devido à HAP.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

A HAP consiste em uma doença de rápida progressão e letal, decorrente de uma doença vascular pulmonar por ação sinérgica de fatores genéticos, epigenéticos e relacionados ao sistema imunológico (MALENFANT et al., 2013). Caracteriza-se patologicamente por uma anormalidade circulatória, resultante do aumento do tônus vascular pulmonar, desequilíbrio de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e proliferação progressiva células musculares e endoteliais, o que resulta em lesões vaso-oclusivas (BOGAARD et al., 2009; TUDER et al., 2009). Em decorrência, há elevação da pós-carga imposta ao VD, gerando conseqüente hipertrofia, dilatação e IC direita (CASSERLY; KLINGER, 2009; HANDOKO et al., 2009).

Os modelos experimentais para o estudo da HAP permitiram o desenvolvimento de todas as alternativas terapêuticas que existem atualmente, sendo que o modelo baseado na administração da MCT (60 mg/Kg) é o mais utilizado (POLONIO et al., 2012).

As alterações estruturais e funcionais determinantes para o estabelecimento da HAP desenvolvem-se de acordo com a dose de monocrotalina administrada e são tempo-dependentes. Como descrito anteriormente, estudos prévios de Buermans et al. (2005) demonstraram que após 4 semanas de aplicação de MCT (30 mg/Kg) houve o desenvolvimento de hipertrofia ventricular direita em ratos machos. Já, Leichsenring-Silva (2011) encontrou mudanças estruturais no VD, por conta da HAP induzida, aos 21 dias após a aplicação de 60 mg/Kg de MCT em ratos Wistar machos. Porém, ainda são escassos os estudos que demonstrem, especificamente, as alterações morfológicas e funcionais sobre o desenvolvimento e progressão da HAP aos 7 e 14 dias após a aplicação de MCT.

Sendo a HAP uma doença de rápida progressão e alta mortalidade, principalmente em decorrência da insuficiência cardíaca que se desenvolve, novas abordagens terapêuticas precisam ser testadas para que a taxa de sobrevivência dos pacientes, com o tratamento, aumente. Uma vez que as alterações funcionais do VD na progressão da HAP não estão bem elucidadas, faz-se necessário uma análise temporal aos 7 e 14 dias após a administração de monocrotalina, visando demonstrar e caracterizar as principais alterações estruturais, funcionais, histológicas e morfométricas no coração, pulmão e artéria pulmonar, ao decorrer desta doença.



Desta forma, será possível o desenvolvimento de alternativas terapêuticas de acordo com a janela de progressão da doença, podendo tornar o tratamento mais efetivo e aumentar a sobrevida e qualidade de vida destes pacientes.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo Geral

Análise tempo-dependente dos mecanismos de progressão da HAP induzida por monocrotalina e seus efeitos, com base em alterações, no ventrículo direito e artéria pulmonar, de parâmetros morfométricos, funcionais, de estresse oxidativo e de regulação dos componentes do sistema nervoso autônomo.

### 1.5.2 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 e determinar o índice de contratilidade ( $dP/dt_{máx}$ ) e relaxamento do VD ( $dP/dt_{mín}$ ).
- Avaliar a função autonômica cardíaca e vascular por meio dos componentes simpático e parassimpático.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo na artéria pulmonar, através da atividade da enzima NADPH oxidase.
- Avaliar a expressão, na artéria pulmonar, de receptores de endotelina (ET-A e ET-B) e da enzima endotelial sintetizadora de NO (eNOS).
- Mensurar as modificações induzidas pela monocrotalina na reatividade vascular da artéria pulmonar, através da avaliação da resposta do vaso à fenilefrina (vasoconstritora) e à acetilcolina (vasodilatadora).

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Análise temporal dos efeitos cardiovasculares causados pela monocrotalina em modelo de hipertensão arterial pulmonar**

Luiza Mezzomo Donatti<sup>1</sup>, Bruna Gazzi de Lima-Seolin<sup>1</sup>, Aleksandra Zimmer<sup>1</sup>, Rayane Brinck Teixeira<sup>1</sup>, Karina Rabello Casali<sup>2</sup>, Nathane Santanna Felix<sup>3</sup>, Patrick Turck<sup>1</sup>, Giana Blume Corssac<sup>1</sup>, Vanessa Duarte Ortiz<sup>1</sup> e Adriane Belló-Klein<sup>1</sup>.

**1** Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Espécies Reativas de Oxigênio, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brasil.

**2** Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo – São Paulo, Brasil.

**3** Laboratório de Investigação Pulmonar, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, Brasil.

**Autor correspondente:** Prof. Adriane Belló-Klein

Telefone: 0-55-51-33083621 Fax: 0-55-51-33083656 E-mail: [belklein@ufrgs.br](mailto:belklein@ufrgs.br)

#### **Contatos:**

Luiza Mezzomo Donatti: [luizadonatti@hotmail.com](mailto:luizadonatti@hotmail.com)

Bruna Gazzi de Lima Seolin: [bruna.gazzi@hotmail.com](mailto:bruna.gazzi@hotmail.com)

Aleksandra Zimmer: [zimmeralexsandra@gmail.com](mailto:zimmeralexsandra@gmail.com)

Rayane Brinck Teixeira: [rayca\\_shumi@hotmail.com](mailto:rayca_shumi@hotmail.com)

Karina Rabello Casali: [rabellocasali@gmail.com](mailto:rabellocasali@gmail.com)

Nathane Santanna Felix: [nathanefelix@gmail.com](mailto:nathanefelix@gmail.com)

Patrick Turck: [p.turck@gmail.com](mailto:p.turck@gmail.com)

Giana Blume Corssac: [gicorssac@gmail.com](mailto:gicorssac@gmail.com)

Vanessa Duarte Ortiz: [vanessa\\_ro994@hotmail.com](mailto:vanessa_ro994@hotmail.com)

## RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) caracteriza-se pelo desequilíbrio de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e pela proliferação de células musculares e endoteliais. Ainda, a vasculatura pulmonar apresenta exacerbado tônus vasoconstritor. Esse estudo teve como objetivo realizar uma análise tempo-dependente, aos 7 e 14 dias, dos mecanismos de progressão da HAP induzida monocrotalina (MCT). Ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: CTR7 e CTR14; MCT7 e MCT14. Os grupos MCT7 e MCT14 receberam uma única injeção intraperitoneal de MCT (60 mg/Kg) e os grupos CTR7 e CTR14, o mesmo volume de salina. Ao final do protocolo, realizou-se o cateterismo do ventrículo direito (VD) e da artéria femoral, coleta dos órgãos. A administração de MCT diminuiu a reatividade da artéria pulmonar nos grupos MCT7 e MCT14 e elevou a pressão média da artéria pulmonar, a pressão sistólica do VD e a atividade da NADPH oxidase no grupo MCT14. Não houve diferença significativa nos parâmetros do SNA entre os grupos. As alterações induzidas pela MCT envolvem a responsividade e a estrutura da vasculatura pulmonar, estando mais evidentes a partir dos 14 dias, apesar de o quadro de HAP já estar bem estabelecido aos 7 dias.

Palavras-chave: Hipertensão arterial pulmonar. Monocrotalina. Reatividade vascular. Estresse oxidativo.

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é definida pela elevação da pressão média da artéria pulmonar (PAPm) igual, ou superior, a 25 mmHg em condições de repouso, avaliada pelo cateterismo do ventrículo direito (VD) [1,2]. Consiste em uma doença letal e de rápida progressão, sendo que a lesão vascular subjacente à HAP é determinada por susceptibilidades genéticas ou em associação com outros estados patológicos e é, provavelmente, uma resposta final a fatores ambientais [3]. A HAP é diagnosticada com maior frequência em pacientes mais velhos, em torno dos 50 anos de idade, tem prevalência de 15 casos por um milhão de habitantes e, a cada ano, 24 novos casos de HAP são registrados dentre um milhão de adultos [4–6].

Três anormalidades vasculares são as principais causadoras de HAP: remodelamento vascular; trombose e vasoconstrição [7]. A HAP é uma doença caracterizada pela anormalidade circulatória resultante do desequilíbrio de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e proliferação progressiva de células musculares e endoteliais, o que resulta em lesões vaso-oclusivas [8,9]. Além disso, a vasculatura pulmonar apresenta certo grau de disfunção endotelial, resultando em um exacerbado tônus vasoconstritor [10]. O remodelamento das artérias e arteríolas pulmonares, em decorrência desses mecanismos vasoconstritores, resulta no aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e da PAPm, sinal clássico da HAP. A elevação da PAPm desencadeia a sucessão de eventos até o desfecho final da HAP, pois acarreta em um aumento de trabalho imposto ao VD, visto que é preciso superar pressões maiores que o normal para ejetar a mesma quantidade de sangue [8,11]. Para compensar o aumento da pós-carga, o VD desenvolve uma hipertrofia concêntrica, através da síntese proteica e adição de sarcômeros. Assim, o VD aumenta a espessura da parede e assume uma forma mais arredondada [8,11,12].

Os sintomas da HAP são bastante inespecíficos, sendo que, na fase inicial da doença, os sintomas só são visíveis durante o esforço e se restringem à falta de ar, fadiga, fraqueza, angina e síncope [5]. A funcionalidade do VD está intimamente associada com os sintomas apresentados pelos pacientes e o grau de severidade da doença, posto que a insuficiência cardíaca (IC) direita é a principal causa de óbito [11,13]. O prognóstico dos pacientes e a taxa de sobrevida ainda são insatisfatórios, apesar do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e do maior entendimento da patofisiologia da HAP [2]. Pacientes que não são tratados apresentam uma taxa de sobrevida de 2,8 anos, enquanto que os pacientes que recebem o tratamento adequado têm uma sobrevida de 7 anos [2,4,6,14].

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas formadas, naturalmente, como bioproductos da redução do oxigênio e, em baixas concentrações, as EROs agem como moléculas sinalizadoras e mensageiros secundários em algumas rotas metabólicas [15,16]. Entretanto, em situação de estresse oxidativo, altos níveis dessas moléculas acabam sendo prejudiciais às células devido às interações deletérias das EROs com lipídeos de membrana, proteínas e moléculas de DNA [15,17,18]. No desenvolvimento e progressão da HAP, o estresse oxidativo desempenha importante papel, pois a exacerbada produção de EROs na vasculatura pulmonar está associada ao remodelamento e disfunção vascular, visto que modulam a liberação, ou atividade, de diversas substâncias vasoativas que afetam o tônus vascular e fatores que influenciam na espessura da parede dos vasos [15].

As alterações vasculares vistas na HAP não acarretam, apenas, em alterações estruturais do VD, causam, também, importantes alterações hemodinâmicas e funcionais no sistema cardiovascular. Entre as principais alterações está o aumento da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD), como consequência direta da elevação da PAPm [19]. O sistema nervoso autônomo (SNA), através da ação da noradrenalina e da acetilcolina, secretadas, respectivamente, pelo sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP), afeta a funcionalidade do sistema cardiovascular, sendo o melhor mecanismo fisiológico para elevar, de maneira aguda, a performance do miocárdio e manter, ou reestabelecer, a volumes adequados de débito cardíaco [20,21]. Estudos demonstram que, na HAP, há um desequilíbrio do SNA, caracterizado pela elevação da atividade simpática e diminuição da atividade parassimpática, simultaneamente, como resposta adaptativa à elevação da pós-carga imposta ao VD [22]. Porém, a hiperatividade crônica do SNS é um importante fator patofisiológico da HAP, uma vez que acelera a progressão da doença, levando à falência do VD [21].

Os modelos experimentais para o estudo da HAP permitiram o desenvolvimento de todas as alternativas terapêuticas que existem atualmente e todo conhecimento da patofisiologia da doença. A administração de monocrotalina (MCT) em ratos tem sido o principal modelo utilizado para explorar os mecanismos envolvidos na HAP, uma vez que as alterações cardiovasculares e pulmonares são similares às dos pacientes [23–26]. Nas arteríolas e artérias pulmonares, através do desencadeamento de uma resposta inflamatória com resposta hipertrófica e hiperplásica das células musculares lisas, desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras e elevação da pressão arterial pulmonar, a

dehidromonocrotalina, metabólito ativo da MCT, leva ao surgimento progressivo de HAP severa e irreversível [27,28].

As alterações estruturais e funcionais determinantes para o estabelecimento da HAP desenvolvem-se de acordo com a dose de MCT administrada e são tempo-dependente. Visto que ainda são escassos os estudos que demonstrem, especificamente, as alterações morfológicas e funcionais sobre o desenvolvimento e progressão da HAP aos 7 e 14 dias após a aplicação de MCT, o principal objetivo deste trabalho foi realizar uma análise tempo-dependente dos mecanismos de progressão da HAP induzida por monocrotalina e seus efeitos, com base em alterações de parâmetros morfométricos, funcionais, de estresse oxidativo e de regulação dos componentes do sistema nervoso autônomo [29].

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS

O presente estudo está de acordo com todas as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e foi aprovado sob processo de número 32151. Este trabalho é segmento da pesquisa de doutorado desenvolvida pela aluna Alexsandra Zimmer no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS.

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos (180±10 gramas, no início do estudo) provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL). Os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo mantidos em caixas plásticas (27 x 26 x 31 cm) com assoalho coberto por serragem. Receberam água e alimento *ad libitum* em um ambiente controlado, com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 20 – 25°C e umidade de 70%.

### 2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n= 12 animais/ grupo):

**1) CTR 7:** animais que receberam a administração de solução salina e foram eutanasiados ao final do sétimo dia;

**2) MCT 7:** animais que receberam a administração de MCT e foram eutanasiados ao final do sétimo dia;

**3) CTR 14:** animais que receberam a administração de solução salina e foram eutanasiados ao final do décimo quarto dia;

**4) MCT 14:** animais que receberam a administração de MCT e foram eutanasiados ao final do décimo quarto dia;

No final do período de ambientação (3 dias), os animais dos grupos MCT 7 e MCT 14 receberam uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de monocrotalina (60 mg/Kg) (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EUA) [30]. Os animais dos grupos controle (CTR 7 e CTR 14) receberam volume equivalente de solução salina [31].

Ao término do protocolo experimental, os animais foram anestesiados através da aplicação intraperitoneal de quetamina (90 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e encaminhados para o cateterismo da artéria femoral e ventrículo direito [32]. Em seguida, enquanto ainda anestesiados, foram decapitados e tiveram a artéria pulmonar, coração, pulmões e fígado coletados.

### 2.3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

A hipertrofia do ventrículo direito foi analisada através da razão entre a massa do ventrículo direito e a massa corporal (mg/g), conforme descrito por *Hu et al (2003)*, e entre a massa do ventrículo direito pela massa do ventrículo esquerdo (g/g) [30,33].

Os dois lobos esquerdos do pulmão e o lobo lateral esquerdo do fígado foram pesados e acondicionados em uma estufa a uma temperatura controlada de 65°C. Esses órgãos foram pesados diariamente até que atingissem um peso constante. O índice de congestão pulmonar e hepática foi determinado, então, pela relação entre o peso úmido e o peso seco dos respectivos órgãos [30].

### 2.4 REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE ARTÉRIA PULMONAR

O segmento mais próximo ao coração da artéria pulmonar de 4 animais por grupo foi retirado e submetido ao teste de reatividade vascular, através de sistema de banhos de órgãos isolados (AVS Projetos) conectados a transdutores de pressão e de força de contração isométrica e a um sistema de aquisição de dados biológicos (Biopac System) [34].

Os anéis de artéria pulmonar foram montados em hastes paralelas, colocados em cubas preenchidas com 10mL de solução de Tyrode modificada (123 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15,5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11,5 mM dextrose, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), mantida a 37°C, pH 7,4 e oxigenada incessantemente com gás carbogênio 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, e tensionados a 1,5 gf durante 2 horas, para estabilização do sistema de registro de contração isométrica.

Após a estabilização, os anéis foram expostos a concentrações crescentes de fenilefrina (10<sup>-10</sup> M – 3x10<sup>-4</sup> M) até atingirem o platô de contração. Na sequência, os anéis foram lavados com solução Tyrode modificada e doses crescentes de acetilcolina (10<sup>-11</sup> M – 3x10<sup>-4</sup> M) foram adicionadas ao banho, induzido o relaxamento vascular e permitindo avaliar a reatividade vascular da artéria pulmonar [35].

Os resultados de relaxamento pela acetilcolina são expressos pela porcentagem de relaxamento a partir da concentração máxima induzida pela fenilefrina [36].

## 2.5 PREPARAÇÃO DO TECIDO

As demais artérias pulmonares, que não foram utilizadas no teste de reatividade vascular, previamente coletada dos animais e congelada em nitrogênio líquido, foram maceradas, homogeneizada em 1:10 de tampão de lise celular (Cell Signaling) e em 1:100 PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil) 20 mmol/L, através do uso de homogeneizador Ultra-Turrax, e, seguidamente, submetida ao sonicador Hielscher Ultrasound Technology (amplitude de 70%, 0,4 ciclos) [37].

A suspensão foi centrifugada (3000 rpm, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para análise bioquímica e de expressão protéica.

## 2.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOT

Foram analisadas as expressões da proteína receptora de endotelina, ETAR, e da enzima eNOS em amostra do homogeneizado de artéria pulmonar. A obtenção da amostra, eletroforese e transferência proteica foram realizadas como descrito por Laemmli (1970) [38]. Quarenta e cinco microgramas (µg) de proteína foi aplicada em gel SDS-PAGE unidimensional 10%. Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados pela correspondência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). As membranas



foram preparadas para a imunodeteccão com o uso dos seguintes anticorpos primários: ETAR (69 KDa) e NOS3 (140 KDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Para a deteccão dos anticorpos primários, foram utilizados anticorpos secundários de acordo com a origem dos primários (anti-mouse ou anti-rabbit) e a membrana revelada pelo método de quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram avaliados quantitativamente pelo densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). Os resultados de cada membrana foram normalizados pela expressão da proteína alfa-actinina.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA – NADPH OXIDASE

A atividade da NADPH oxidase foi determinada em homogeneizado de artéria pulmonar por meio de técnica espectrofotométrica descrita por Wei et al (2006) [39].

## 2.8 CATETERISMO DO VENTRÍCULO DIREITO

A veia jugular direita dos animais foi exposta e uma cânula, preenchida com NaCl 0,9%, composta por tubo de polietileno PE-50, foi inserida no lúmen da veia e introduzida até o ventrículo direito. A monitorização da PSVD, PDFVD,  $dP/dt_{mín}$  e  $dP/dt_{máx}$  foi realizada através da conexão do cateter ao transdutor de pressão (Narco Biosystems) conectado a um amplificador de sinal (Hewlett Packard), sendo os sinais analógicos das pressões digitalizados (Windaq-Data Acquisition System) e expressos em mmHg [19]. Para estimar a PAP, foi utilizada a fórmula:  $PAP (mmHg) = 0,61 \times PAP \text{ sistólica} + 2$  [40].

## 2.9 CATETERISMO DA ARTÉRIA FEMORAL

A artéria femoral direita foi exposta, através da tricotomia e incisão entre o quadrante medial superior e inferior na região proximal do membro inferior, e uma cânula de polietileno P-10 de 5 cm previamente soldada a um tubo de Tygon<sup>®</sup> de 16 cm preenchida com NaCl 0,9% foi inserida [41].

Para monitoramento da pressão arterial sistólica e diastólica e frequência cardíaca, a cânula 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 1000Hz / Pressure Amplifier HP 8850C). Os sinais analógicos das

pressões (mmHg) foram digitalizados (Windaq-Data Acquisition System; Akron, Ohio - EUA) [42].

## 2.10 ANÁLISE ESPECTRAL

A frequência cardíaca foi calculada através do intervalo de tempo entre dois picos sistólicos consecutivos ou intervalos de pulso identificados pelo cateterismo da artéria femoral. Dois componentes espectrais foram considerados: alta frequência (HF), 1,00-5,00 Hz e baixa frequência (LF), 0,10-1,00 Hz; os componentes espectrais estão expressos em valores absolutos (abs) e unidades normalizadas (nu). A razão LF/HF representa o balanço simpato-vagal sobre a frequência cardíaca e pressão arterial [43].

Para a análise desses parâmetros foi utilizado o modelo auto regressivo aplicado a sequências de 250 batimentos cardíacos escolhidas randomicamente, sendo que, apenas padrões consistentes foram considerados [44].

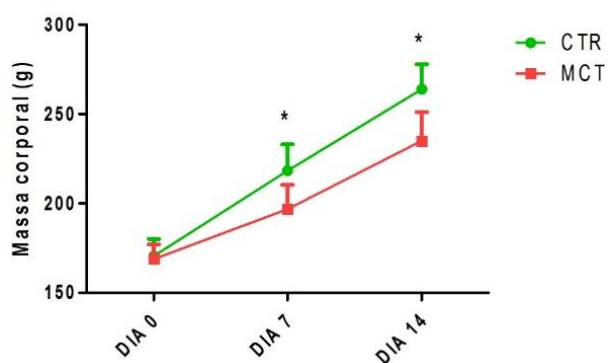
## 2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade da amostra através do teste de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo pós-teste de Student Newman Keuls. O Teste t não pareado foi utilizado para avaliar os resultados do teste de reatividade vascular da artéria pulmonar. O software GraphPad InStat, versão 5.01 para Windows, foi utilizado como ferramenta para a análise dos dados. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

# 3 RESULTADOS

## 3.1 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS

O peso corporal dos animais de ambos grupos MCT (MCT 7 e MCT 14) diferiu significativamente dos animais dos grupos CTR (CTR 7 e CTR 14) a partir do 7º dia após a aplicação da MCT. Os grupos CTR ganharam, no 7º e 14º dia, respectivamente, 9,8% e 12,2% mais massa corporal que os grupos MCT (Figura 7).



**Figura 7. Análise temporal da massa corporal de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de MCT (60 mg/Kg i.p.), ou salina, no dia 0. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$  MCT vs CTR.

Os animais do grupo MCT 14 apresentaram um aumento significativo na massa do VD e no índice de hipertrofia, avaliado pela razão entre a massa do VD e a massa do VE, em relação ao grupo MCT 7 e a ambos grupos controle (CTR 7 e CTR 14), demonstrado na Tabela 2.

Foi observado um aumento de 10,5% na congestão pulmonar do grupo MCT 7, em relação a seu controle, e, nos animais do grupo MCT 14, a congestão pulmonar foi 5,4% maior que nos animais do grupo CTR 14. No fígado, a razão entre o peso úmido e o peso seco do órgão não teve diferença significativa entre os grupos (Tabela 2).

**Tabela 2. Parâmetros morfométricos (Índices de hipertrofia do ventrículo direito e índices de congestão pulmonar e hepática) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo. Resultados obtidos após o término do protocolo experimental.

Parâmetros morfométricos	CTR 7	MCT 7	CTR 14	MCT 14
Massa VD (g)	0,16 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01 <sup>cd</sup>
VD/VE (g/g)	0,31 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,03 <sup>cd</sup>
VD/MC (mg/g)	0,71 $\pm$ 0,07	0,76 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	0,67 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,04 <sup>ac</sup>
Massa pulmão (g)	1,17 $\pm$ 0,02	1,40 $\pm$ 0,19 <sup>ab</sup>	1,18 $\pm$ 0,04	1,93 $\pm$ 0,25 <sup>acd</sup>
Pulmão – P. úmido/seco (g)	4,83 $\pm$ 0,25	5,34 $\pm$ 0,27 <sup>ab</sup>	4,96 $\pm$ 0,17	5,23 $\pm$ 0,17 <sup>ac</sup>
Massa fígado (g)	10,55 $\pm$ 0,88	8,51 $\pm$ 0,61 <sup>b</sup>	11,07 $\pm$ 0,45	10,65 $\pm$ 0,35 <sup>d</sup>
Fígado – P. úmido/seco (g)	3,46 $\pm$ 0,11	3,55 $\pm$ 0,12	3,42 $\pm$ 0,08	3,53 $\pm$ 0,10

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 12 animais por grupo. Foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Considerado diferença significativa quando  $P < 0,05$ . CTR 7: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 7 dias; MCT 7: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 7 dias; CTR 14: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 14 dias; MCT 14: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 14 dias.

<sup>a</sup> Grupos que receberam monocrotalina (MCT 7 e MCT 14) diferiram dos grupos que receberam solução salina (CTR 7 e CTR 14);

<sup>b</sup> Grupo MCT 7 diferiu significativamente do grupo CTR 7;

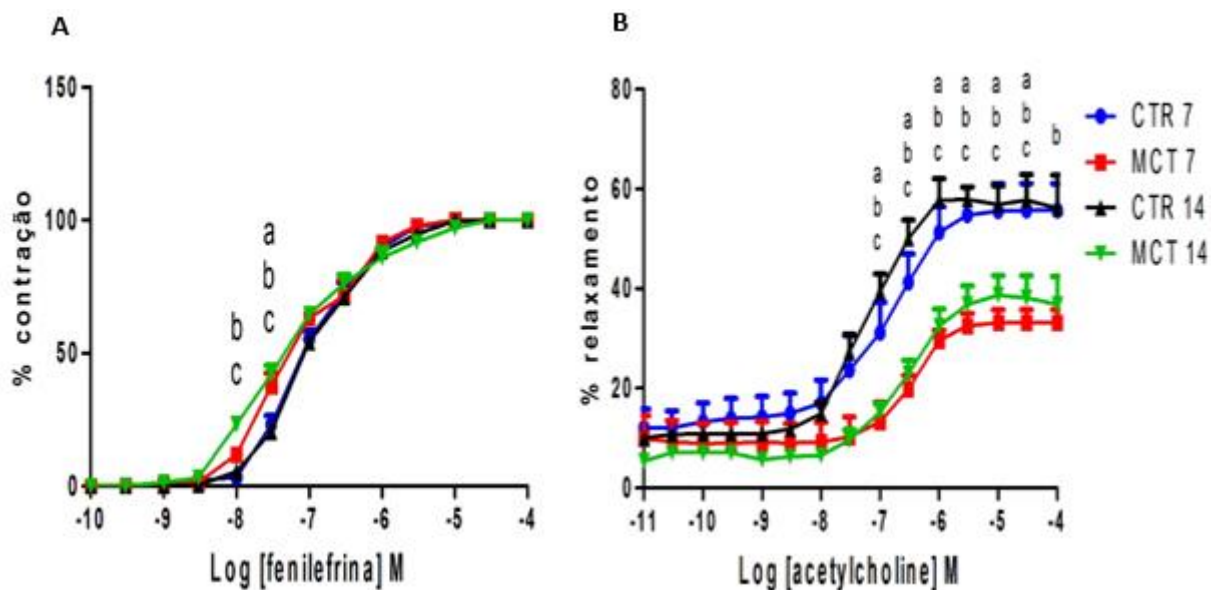
<sup>c</sup> Grupo MCT 14 diferiu significativamente do grupo CTR 14;

<sup>d</sup> Grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 14 dias (MCT 14) diferiu significativamente do grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 7 dias (MCT 7);

### 3.2 REATIVIDADE VASCULAR EM ANEIS ISOLADOS DE ARTÉRIA PULMONAR

A reatividade vascular foi avaliada em anéis isolados da artéria pulmonar. Como representado na Figura 8A, os grupos não apresentaram diferenças significativas na contração máxima em resposta à fenilefrina. No entanto, a acetilcolina induziu um relaxamento, concentração-dependente, diminuído significativamente nos animais com HAP (grupos MCT 7 e MCT 14) em relação aos animais controle (Figura 8B).

A concentração de acetilcolina necessária para provocar o relaxamento de 50% das amostras (IC<sub>50</sub>) e o relaxamento máximo (R<sub>máx</sub>) induzido pela acetilcolina, obtido na concentração de 10 $\mu$ M, estão apresentados na Tabela 3.



**Figura 8. Reatividade vascular da artéria pulmonar de ratos Wistar machos tratados com MCT (60 mg/Kg) ou salina.** (A) Curva de contração induzida por doses crescentes de fenilefrina. (B) Relaxamento induzido por doses crescentes de acetilcolina em anéis de artéria pulmonar pré-contraídos. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo.

**a**  $P < 0.05$  MCT vs CTR;

**b**  $P < 0.05$  MCT7 vs CTR 7;

**c**  $P < 0.05$  MCT14 vs CTR14;

**Tabela 3. IC<sub>50</sub> e relaxamento máximo induzido pela acetilcolina em anéis de artéria pulmonar de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e

foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo. Resultados obtidos após o término do protocolo experimental.

Parâmetros hemodinâmicos	CTR 7	MCT 7	CTR 14	MCT 14
IC <sub>50</sub> (ηM)	134,0	334,5	60,4	256,1
R <sub>máx</sub> (%)	55,6	33,2 <sup>ab</sup>	56,9	38,7 <sup>ac</sup>

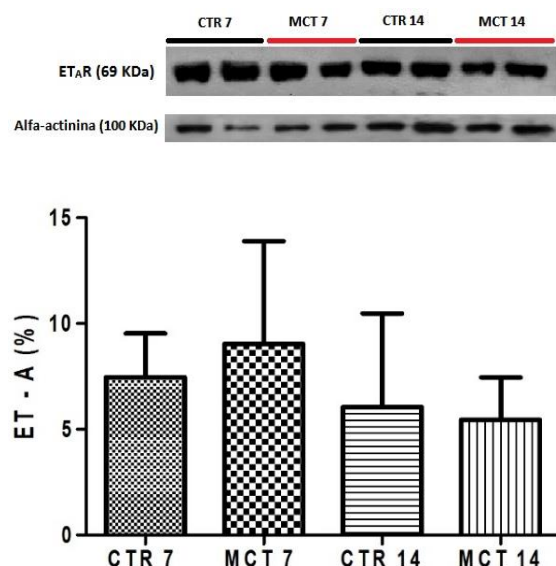
Valores expressos como média de 3 a 4 animais por grupo. Considerado diferença significativa quando  $P < 0,05$ .

CTR 7: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 7 dias; MCT 7: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 7 dias; CTR 14: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 14 dias; MCT 14: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 14 dias.

IC<sub>50</sub>: Concentração para 50% de inibição; R<sub>máx</sub>: Relaxamento máximo com 10μM de acetilcolina. **a**  $P < 0,05$  MCT vs CTR; **b**  $P < 0,05$  MCT7 vs CTR 7; **c**  $P < 0,05$  MCT14 vs CTR14.

### 3.3 EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE ENDOTELINA TIPO A (ET-A)

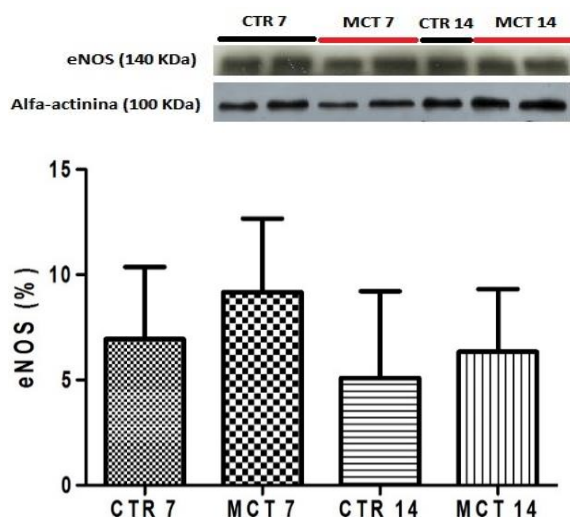
Não foram encontradas diferenças significativas na expressão do receptor A da endotelina entre os quatro grupos experimentais (Figura 9).



**Figura 9. Imunoconteúdo do receptor A da endotelina (ET-A) em homogeneizado de artéria pulmonar de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 2 a 4 animais por grupo. Considerado diferença significativa quando  $P < 0,05$ . CTR 7: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 7 dias; MCT 7: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 7 dias; CTR 14: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 14 dias; MCT 14: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 14 dias.

### 3.4 EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE ENDOTELIAL (eNOS)

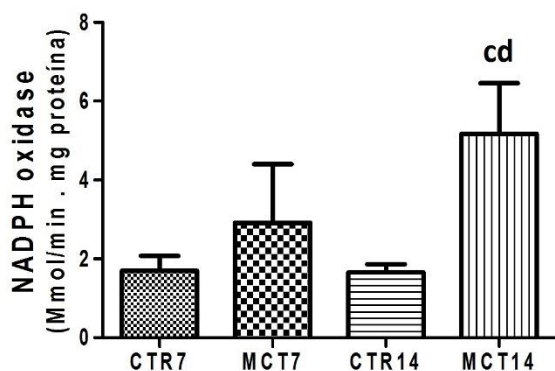
Não houve diferença significativa na expressão da enzima eNOS, uma importante fonte de NO endógeno, entre os grupos controles e os grupos que receberam a MCT (Figura 10).



**Figura 10. Imunoconteúdo da eNOS em homogeneizado de artéria pulmonar de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 5 animais por grupo. Considerado diferença significativa quando  $P < 0,05$ . CTR 7: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 7 dias; MCT 7: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 7 dias; CTR 14: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 14 dias; MCT 14: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 14 dias.

### 3.5 PARÂMETRO DE ESTRESSE OXIDATIVO – ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE NADPH OXIDASE

A atividade da NADPH oxidase é uma importante fonte do radical superóxido na artéria pulmonar [17]. Sua atividade foi encontrada elevada significativamente no grupo MCT 14, em relação aos animais controles (grupos CTR 7 e CTR 14) e ao grupo MCT 7 (Figura 11). O grupo MCT 14 teve a atividade da NADPH oxidase 2,5 vezes maior que o grupo CTR 14.



**Figura 11. Atividade da enzima NADPH oxidase em homogeneizado de artéria pulmonar de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 8 animais por grupo. Considerado diferença significativa quando  $P < 0,05$ . CTR 7: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 7 dias; MCT 7: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 7 dias; CTR 14: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 14 dias; MCT 14: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 14 dias.

<sup>a</sup> Grupos que receberam monocrotalina (MCT 7 e MCT 14) diferiram dos grupos que receberam solução salina (CTR 7 e CTR 14);

<sup>b</sup> Grupo MCT 7 diferiu significativamente do grupo CTR 7;

<sup>c</sup> Grupo MCT 14 diferiu significativamente do grupo CTR 14;

<sup>d</sup> Grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 14 dias (MCT 14) diferiu significativamente do grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 7 dias (MCT 7);

### 3.6 PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

O grupo MCT 7 não apresentou diferenças significativas em relação ao seu controle. Por outro lado, o grupo MCT 14 demonstrou uma elevação expressiva na PSVD,  $dP/dt_{\text{máx}}$  (índice de contratilidade) e  $dP/dt_{\text{mín}}$  (índice de relaxamento) quando comparado com o grupo MCT 7 (28%, 18% e 63%) e, também, em relação aos grupos CTR (57%, 46% e 61%, respectivamente). A frequência cardíaca e a PDFVD não diferiram entre os quatro grupos analisados. Ambas pressões arteriais, sistólica e diastólica, não foram alteradas significativamente. Esses resultados estão apresentados na Tabela 4.

Nos animais do grupo MCT 14 a pressão da artéria pulmonar (PAP) aumentou 50% em relação aos animais que não receberam a droga (grupos controle) e, comparando ao grupo MCT 7, houve uma elevação de 35% (Figura 12).

**Tabela 4. Parâmetros hemodinâmicos (cateterismo do ventrículo direito e artéria femoral) de ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo. Resultados obtidos após o término do protocolo experimental.

Parâmetros hemodinâmicos	CTR 7	MCT 7	CTR 14	MCT 14
FC (bpm)	300 ± 32	275 ± 29	286 ± 26	267 ± 26
PSVD (mmHg)	26 ± 6	32 ± 6	29 ± 7	41 ± 4 <sup>cd</sup>
PDFVD (mmHg)	3 ± 2	5 ± 2	3 ± 1	4 ± 1
dP/dt <sub>máx</sub> (mmHg/s)	1365 ± 236	1681 ± 133	1456 ± 322	2000 ± 87 <sup>cd</sup>
dP/dt <sub>min</sub> (mmHg/s)	897 ± 175	888 ± 66	957 ± 180	1450 ± 214 <sup>cd</sup>
Pressão arterial sistólica (mmHg)	127 ± 22	126 ± 20	142 ± 27	136 ± 39
Pressão arterial diastólica (mmHg)	87 ± 12	87 ± 16	99 ± 19	94 ± 24

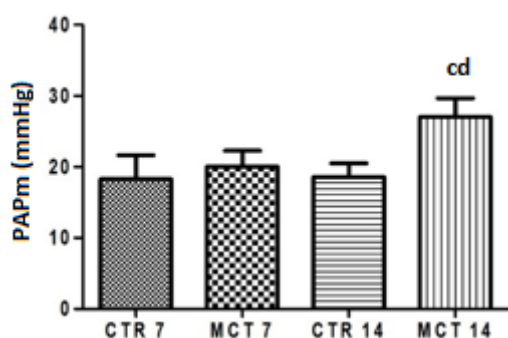
Valores expressos como média ± desvio padrão de 4 a 7 animais por grupo. Foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Considerado diferença significativa quando  $P < 0,05$ . CTR 7: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 7 dias; MCT 7: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 7 dias; CTR 14: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 14 dias; MCT 14: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 14 dias.

<sup>a</sup> Grupos que receberam monocrotalina (MCT 7 e MCT 14) diferiram dos grupos que receberam solução salina (CTR 7 e CTR 14);

<sup>b</sup> Grupo MCT 7 diferiu significativamente do grupo CTR 7;

<sup>c</sup> Grupo MCT 14 diferiu significativamente do grupo CTR 14;

<sup>d</sup> Grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 14 dias (MCT 14) diferiu significativamente do grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 7 dias (MCT 7);



**Figura 12. Pressão média da artéria pulmonar (PAP) em ratos Wistar machos.** Os animais receberam injeção única de MCT (60 mg/Kg i.p.), ou salina, e foram eutanasiados após 7 ou 14 dias. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão.

<sup>a</sup> Grupos que receberam monocrotalina (MCT 7 e MCT 14) diferiram dos grupos que receberam solução salina (CTR 7 e CTR 14);

<sup>b</sup> Grupo MCT 7 diferiu significativamente do grupo CTR 7;

<sup>c</sup> Grupo MCT 14 diferiu significativamente do grupo CTR 14;



<sup>d</sup> Grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 14 dias (MCT 14) diferiu significativamente do grupo que recebeu monocrotalina e foi eutanasiado após 7 dias (MCT 7);

### 3.7 AVALIAÇÃO AUTONÔMICA – ANÁLISE ESPECTRAL

Tanto a faixa de baixa frequência normalizada (LFnu) quanto a faixa de alta frequência normalizada (HFnu), indicadores da porcentagem da modulação autonômica exercida na atividade cardiovascular pelo sistema nervoso simpático e parassimpático, respectivamente, não apresentaram diferença significativa entre os grupos CTR e MCT.

A relação LF/HF, que caracteriza o balanço simpato-vagal sobre o coração, também não diferiu significativamente entre os quatro grupos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5. Análise espectral no domínio da frequência.** Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/Kg) ou salina e foram acompanhados por 7 ou 14 dias, de acordo com o grupo. Resultados obtidos após o término do protocolo experimental.

<b>Parâmetros hemodinâmicos</b>	<b>CTR 7</b>	<b>MCT 7</b>	<b>CTR 14</b>	<b>MCT 14</b>
<b>FC (bpm)</b>	327 ± 32	310 ± 34	329 ± 42	350 ± 12
<b>LF (nu)</b>	10 ± 4	6 ± 3	7 ± 4	6 ± 3
<b>HF (nu)</b>	89 ± 6	94 ± 3	89 ± 4	94 ± 2
<b>LF/HF</b>	0,12 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,03

Valores expressos como média ± desvio padrão de 3 a 4 animais por grupo. Considerado diferença significativa quando  $P < 0,05$ . CTR 7: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 7 dias; MCT 7: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 7 dias; CTR 14: animais que receberam solução salina e foram eutanasiados após 14 dias; MCT 14: animais que receberam monocrotalina e foram eutanasiados após 14 dias. FC: frequência cardíaca; LF: baixa frequência (componente simpático); HF: alta frequência (componente parassimpático); LF/HF: balanço simpato-vagal.

Não houve diferença significativa entre os grupos.

#### 4. DISCUSSÃO

O presente trabalho busca contribuir para o entendimento da progressão da HAP, com base em análises de alterações morfológicas, funcionais e hemodinâmicas, com foco no sétimo e no décimo quarto dia após a indução da doença, uma vez que as características desse período ainda não estão bem descritas na literatura disponível atualmente. Para tanto, foi utilizado um modelo de HAP já bem estabelecido.

A administração intraperitoneal de MCT permite, de maneira simples e rápida, a reprodução do modelo de HAP [24]. A utilização desse alcaloide como modelo experimental para estudos envolvendo a HAP tem sido cada vez mais frequente, visto que as alterações induzidas no sistema cardiovascular e pulmonar são similares às alterações encontradas nos pacientes [26,45]. As modificações estruturais, morfométricas e funcionais desenvolvidas nos animais, após a administração de MCT, são fundamentais para confirmar a instauração da doença. Estudos prévios demonstraram que uma única administração intraperitoneal de MCT, 60 mg/Kg, é eficaz para desenvolver HAP e, posterior, IC [27,30].

Dentre as características do modelo, destaca-se a diminuição da massa corporal dos animais com HAP [12]. Resultados do nosso estudo demonstram que, a partir do sétimo dia após a aplicação da MCT, os animais que receberam salina (grupos CTR 7 e CTR 14) ganharam, significativamente, mais massa corporal que os animais dos grupos MCT 7 e MCT 14. Esses dados corroboram com dados encontrados em demais estudos do nosso grupo de pesquisa [22,46,47] e também vão ao encontro de outros trabalhos já publicados, os quais também descrevem a significativa redução de ganho de massa corporal por parte dos animais que receberam a MCT [12,19,48]. É sabido que doenças pulmonares acarretam em prejuízos da capacidade ventilatória e, conforme a doença progride, as respirações tornam-se mais rápidas e exigem maior esforço. Tais fatores resultam aumento do gasto energético e colaboram para a diminuição do peso corporal dos animais doentes [48–50]. Ainda, a falta de apetite e diminuição do peso corporal são sinais iniciais clássicos de doenças pulmonares [51].

Os principais mecanismos patológicos da HAP envolvem o remodelamento e disfunção endotelial de artérias e arteríolas da vasculatura pulmonar. O aumento da resistência vascular pulmonar, resultante das modificações físicas e funcionais dos vasos, acarreta na elevação da pós-carga imposta ao VD, uma vez que esse ventrículo e a vasculatura pulmonar estão diretamente interligados [12,52]. Devido à rápida capacidade adaptativa do VD, ocorre o desenvolvimento de hipertrofia compensatória, permitindo que a sobrecarga de pressão que é imposta ao coração durante a HAP seja superada [8,53,54].

A hipertrofia do VD é caracterizada pelo aumento da massa muscular da câmara, resultado do aumento do tamanho dos cardiomiócitos e aumento da síntese proteica [8,11]. Ao analisarmos o índice de hipertrofia do VD, foi observado, além do aumento da massa do VD, o desenvolvimento de hipertrofia ventricular direita nos animais do grupo MCT 14. Na literatura, poucos relatos de hipertrofia no período inicial da doença são encontrados, porém, o mesmo padrão de desenvolvimento da hipertrofia do VD é descrito em estudos prévios [55,56]. Após 7 dias de administração da MCT, não houve diferença no índice de hipertrofia entre os animais dos grupos controle e os animais do grupo MCT 7. Sabe-se que a hipertrofia é consequência de alterações na vasculatura pulmonar induzidas pela MCT e que a disfunção ventricular é dependente do tempo e da dose de MCT utilizada. Logo, o modelo experimental utilizado neste estudo (MCT 60 mg/Kg), não desenvolve hipertrofia do VD durante a primeira semana após indução da HAP [53,55]. O estado funcional do VD é determinante para o prognóstico da doença, porque a hipertrofia do VD pode evoluir a quadros de dilatação desta câmara, insuficiência da valva tricúspide, desvio do septo interventricular e insuficiência ventricular direita, acarretando na morte prematura do paciente [13,57].

Um sinal clássico da HAP nesse modelo experimental é a presença da congestão pulmonar aos 21 dias após a aplicação da MCT [22]. Juntamente com as alterações citadas anteriormente, esse parâmetro é importante para a confirmar a eficácia do modelo. Nossos resultados indicam que há congestão pulmonar desde o sétimo dia após a indução da HAP, visto que os grupos MCT 7 e MCT 14 apresentaram maior razão entre o peso úmido e o peso seco do pulmão, em relação aos grupos CTR 7 e CTR 14. Nessa etapa da doença, a congestão pulmonar se deve, possivelmente, ao infiltrado monocitário, edema e espessamento dos septos interalveolares [58–60].

Wilson e colaboradores apontaram a presença de macrófagos na camada adventícia de veias e artérias intra-acinares após 8 e 24 horas, respectivamente, do tratamento; durante a segunda semana da doença o mesmo estudo indicou a presença de mastócitos na camada adventícia de toda vasculatura pulmonar [61]. Esses dados justificam a congestão pulmonar encontrada em nosso estudo, tanto no sétimo, quanto no décimo quarto dia. Outro estudo com achados de infiltrado inflamatório durante os primeiros 14 dias de progressão da HAP embasa a justificativa dos resultados encontrados em nosso trabalho [58]. O acúmulo de infiltrado inflamatório é a primeira alteração morfológica vista na vasculatura pulmonar, com duração entre o primeiro e décimo quarto dia da doença. A segunda fase do desenvolvimento da HAP, que ocorre entre o décimo quarto e vigésimo primeiro dia, corresponde à regressão do quadro

inflamatório, seguido de remodelamento de vasos pulmonares [58,60,61]. As alterações contráteis e respostas secretoras do músculo liso das artérias, entretanto, iniciam ainda na primeira semana, entre o quarto e oitavo dia após a administração de MCT [61].

Devido ao metabolismo hepático que a MCT é submetida, danos celulares podem estar presentes nesse órgão, tanto pela toxicidade da MCT, quanto pela alta demanda de trabalho exigida para convertê-la no metabólito ativo, a dehidromonocrotalina [46]. Contudo, a congestão hepática não apresentou diferença significativa em nenhum dos grupos estudados. A escassez de trabalhos abordando esse período inicial da HAP é um fator limitante para compararmos nossos resultados. Mas, diversos trabalhos que utilizaram o mesmo modelo experimental e avaliaram o índice de congestão hepática aos 21 dias após a administração de MCT, também não obtiveram diferenças significativas entre os grupos [22,46,62]. O estudo desenvolvido por Brown et al também não apresentaram o desenvolvimento de congestão hepática, apesar de utilizar uma maior dose de MCT (105 mg/Kg) e realizar as avaliações posteriormente, no vigésimo oitavo e no quadragésimo segundo dia [46].

Com base nos dados dos animais que receberam MCT apresentados até o momento (redução do ganho de massa corporal, desenvolvimento de hipertrofia do VD, presença de congestão pulmonar e ausência de congestão hepática), pode-se assegurar que o quadro de HAP induzido pela MCT foi confirmado.

A MCT, após sofrer bioativação hepática, tem como principal alvo de atuação a vasculatura pulmonar, devido à proximidade circulatória do fígado e do pulmão e, também, depuração diminuída da 5-hidroxitriptamina nas células endoteliais desses vasos [23,52,58]. Por ser altamente tóxica, a dehidromonocrotalina causa danos no endotélio vascular logo nas primeiras horas após entrar em contato, sendo que, durante a primeira semana após a administração de MCT, é visto um aumento do dano endotelial e surgimento de infiltrado inflamatório e edema [24,52]. A disfunção endotelial é caracterizada pelo prejuízo do endotélio em manter um balanço adequado na síntese e secreção de substâncias vasodilatadoras (NO, prostaciclina) e vasoconstritoras (endotelinas), causando uma redução na capacidade de resposta vasodilatadora induzida pelo NO. Esse fator é o principal determinante para a instalação do tônus vasocontraído típico da HAP [10,63–65].

Entretanto, a MCT não se restringe apenas à camada endotelial, causando alterações celulares e moleculares em todas as camadas dos vasos pulmonares [24,52]. Seguindo o dano endotelial e o quadro inflamatório que foram instalados inicialmente, inicia o remodelamento das artérias e arteríolas pulmonares, em torno do décimo quarto dia após a injeção de MCT

[24,58]. Nessa etapa, a principal alteração que ocorre envolve o espessamento da camada muscular, como foi demonstrado no estudo de Ito e colaboradores [23]. A camada média da artéria pulmonar e de arteríolas de todo o leito vascular pulmonar aumenta de tamanho por conta da hiperplasia das células musculares e pelo desequilíbrio entre a proliferação celular e apoptose, o que resulta na diminuição do lúmen arterial e, por consequência, elevação da resistência vascular [36,61,65].

O dano endotelial causado diretamente pela MCT e o remodelamento vascular que essa droga induz, juntos, acarretam na elevação da pressão arterial pulmonar, principalmente pela diminuição da capacidade vasodilatadora [10,61]. Para testar os prejuízos funcionais induzidos pela MCT na artéria pulmonar, realizamos o teste de reatividade vascular de anéis isolados desse vaso em um sistema de banho de órgãos isolados. A resposta contrátil dos vasos à fenilefrina não apresentou diferenças significativas entre os quatro grupos experimentais. Porém, a vasodilatação induzida pela acetilcolina já está prejudicada aos 7 dias após a administração de MCT, visto que ambos os grupos que receberam MCT (grupos MCT 7 e MCT 14), apresentaram menor capacidade de relaxamento dos anéis de artéria pulmonar do que os animais que receberam salina (grupos CTR 7 e CTR 14). A escassez de experimentos disponíveis na literatura que avaliam o estado reativo da artéria pulmonar na fase inicial da HAP, principalmente aos 7 e 14 dias, é um fator limitante para a sustentação dos nossos resultados. Entretanto, trabalhos realizados com o mesmo modelo experimental, indicam a diminuição da reatividade vascular da artéria pulmonar no vigésimo oitavo dia após a aplicação da MCT [10,36]. Com base no quadro hiporreativo já bem estabelecido na quarta semana após a indução da HAP e no papel desempenhado pelo endotélio na modulação da contratilidade vascular, os resultados obtidos neste estudo sugerem que, já na primeira semana da doença, a disfunção endotelial causada pela MCT na vasculatura pulmonar é capaz de alterar a resposta vasodilatadora da artéria pulmonar e, progressivamente, desenvolver os demais quadros característicos da HAP, como elevação da pressão arterial pulmonar e hipertrofia do VD.

Além das consequências citadas anteriormente, o dano endotelial na vasculatura pulmonar causado pelo metabólito ativo da MCT afeta, também, o metabolismo de importantes substâncias reguladoras do tônus vascular basal, principalmente do NO e da endotelina (ET-1). Essa alteração metabólica é fundamental para o estabelecimento da HAP, devido às consequências que acarreta no sistema vascular e cardíaco [15,52]. O NO desempenha importante papel na manutenção da fisiologia pulmonar, principalmente por manter a baixa pressão e resistência desse leito vascular, através de seu efeito vasodilatador [7,46,66]. Na

vasculatura pulmonar, a síntese do NO é realizada pela enzima eNOS, utilizando a L-arginina como substrato da reação [15]. Por sua ação vasodilatadora e supressora da proliferação de células musculares lisas, a redução da disponibilidade do NO é considerada uma das principais alterações patológicas da HAP, por acarretar menor resposta vasodilatadora [15,33,67,68]. Na HAP, a redução dos níveis de NO pode ser consequência da diminuição da expressão proteica e atividade da eNOS, como demonstram alguns estudos [19,27]. Porém, esses resultados ainda são controversos, visto que há registros que indicam o aumento da expressão do mRNA da eNOS em animais com HAP [69,70].

A expressão proteica da eNOS foi avaliada, em nosso estudo, através dos níveis de imunocontéudo por Western Blot. Nenhuma diferença significativa na expressão dessa enzima foi encontrada entre os grupos controle e os grupos que receberam a MCT. Embora o pequeno N amostral utilizado ser um fator limitante para o resultado encontrado, esses dados corroboram com demais resultados já publicados, embora as análises tenham sido feitas em períodos posteriores da doença [46,71]. A partir do resultado obtido, não se pode inferir que a instalação do tônus contraído e menos responsivo à acetilcolina da artéria pulmonar seja consequência da diminuição da expressão da eNOS, visto que não houve diferença entre os grupos, mas, também, não há indícios de que a disponibilidade do NO esteja inalterada, uma vez que nenhuma análise desse parâmetro foi realizada e a eNOS, por depender da presença de substratos e cofatores para formar o NO, pode gerar  $O_2^{\cdot-}$  na ausência dessas moléculas, ao invés de NO, ou, também, o NO sintetizado pode estar sendo degradado por espécies reativas de oxigênio [15,46].

Sendo que a ET-1 é o principal vasoconstritor secretado pelo endotélio e que a disfunção endotelial causada pela MCT altera sua síntese e liberação, as alterações no seu metabolismo são associadas à instauração e progressão da HAP [72,73]. Dois tipos de receptores associados à proteína G, ET-A e ET-B, medeiam as ações vasoconstritoras da ET-1 na vasculatura pulmonar. Cada um desses receptores é expresso em locais específicos, sendo que o ET-A está presente nas células musculares e fibroblastos das principais artérias pulmonares, enquanto que o ET-B é encontrado, principalmente, na camada muscular das vias aéreas e células endoteliais dos vasos [46,72].

Estudos prévios indicam o aumento dos níveis plasmáticos da ET-1 durante a HAP, contribuindo para a manutenção da contração vascular e elevação da RVP, e, por consequência desse aumento, ocorre a *upregulation* da expressão dos receptores ET-A e ET-B [64,72,74,75]. No presente estudo, níveis plasmáticos de ET-1 não foram mensurados, porém, a expressão do

receptor ET-A foi avaliada por Western Blot e, ao contrário do que era esperado, a expressão desse receptor permaneceu indiferenciada entre os grupos analisados. Apesar desse resultado corroborar com outro estudo realizado pelo nosso grupo [46], o pequeno N amostral utilizado para essa avaliação e o grande desvio padrão existente entre os grupos podem estar interferindo na análise. Todavia, a análise de expressão desse receptor na fase inicial da doença, aos 7 e 14 dias, é inédita e esse curto período de progressão da HAP pode ser o responsável por tal resultado.

Estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre agentes oxidantes e defesas antioxidantes, com prevalência dos primeiros [16,17,76]. O alto nível de estresse oxidativo já é bem consolidado como importante colaborador para o desenvolvimento da HAP, uma vez que, devido ao seu envolvimento na disfunção endotelial, remodelamento vascular, inflamação, proliferação de células musculares lisas e modulação da apoptose, ocasiona todas alterações patofisiológicas da doença [15,77]. Além disso, o estresse oxidativo também está envolvido no remodelamento cardíaco da HAP, pois as EROs atuam na sinalização de crescimento do miocárdio e remodelamento da matriz extracelular, induzindo, assim, o desenvolvimento da hipertrofia no VD [19,76]. Estudos indicam que o estágio funcional do VD está altamente relacionado com o estado redox do miocárdio e que, uma semana após a administração de MCT em ratos machos, a conservação da função adequada do VD está acompanhado com um estado redox equilibrado [17,30].

A primeira ERO formada a partir da molécula de oxigênio é o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), sendo que, na vasculatura pulmonar e no coração, a NADPH oxidase é a principal enzima formadora dessa molécula [16,17,78]. O produto da NADPH oxidase é fundamental para a patogênese da HAP, pois está intimamente associado com a disfunção endotelial e remodelamento da vasculatura pulmonar [15,77]. A literatura afirma que há a elevação dos níveis de  $O_2^{\cdot-}$  após 3 semanas da administração de MCT em ratos e, esse aumento da ERO, também contribui na progressão e na severidade do quadro patológico da HAP, além de causar os danos previamente citados, pois o excesso do  $O_2^{\cdot-}$  diminui os níveis de NO disponível, devido a rápida reação entre o NO e o  $O_2^{\cdot-}$ , resultando na formação de ONOO<sup>-</sup> [46,79].

A partir da análise da atividade da NADPH oxidase em artéria pulmonar, constatamos que houve aumento da atividade enzimática, tanto aos 7, quanto aos 14 dias, nos animais que desenvolveram a HAP, apesar de apenas o grupo MCT 14 apresentar diferença significativa em relação aos controles. A escassez de estudos envolvendo a avaliação da atividade da NADPH oxidase, ou os níveis de  $O_2^{\cdot-}$ , na fase inicial da doença dificultou a comparação dos nossos

resultados. Mas, associando esse achado com resultados anteriormente demonstrados e que sugerem significativa disfunção endotelial, remodelamento vascular e estado vasocontraído já nessa janela temporal da doença - aumento da reatividade da artéria pulmonar e o desenvolvimento da hipertrofia do VD no grupo MCT 14 - a elevação da atividade da NADPH oxidase nos animais que receberam MCT, principalmente os animais do grupo MCT 14, pode ser uma possível explicação.

Alguns parâmetros hemodinâmicos, como as pressões ventriculares e índices de contratilidade ( $dP/dt_{máx}$ ) e relaxamento ( $dP/dt_{mín}$ ), demonstram o estado funcional do VD e, somados às alterações morfométricas já apresentadas, servem como bons indicadores do grau de comprometimento do VD nos estágios da HAP. Diversos estudos que avaliam o modelo experimental de HAP induzida pela MCT evidenciam o aumento da pressão sistólica do VD (PSVD), da pressão diastólica final do VD (PDFVD), da  $dP/dt_{máx}$  e da  $dP/dt_{mín}$  nos animais doentes em diferentes tempos experimentais [12,22,47]. Essas alterações estão relacionadas ao remodelamento da vasculatura, característica típica da HAP, que, por aumentar a resistência vascular pulmonar, gera uma sobrecarga ao VD. Sob essas condições, além do desenvolvimento de hipertrofia compensatória, há a elevação desses parâmetros para que o VD consiga manter um débito cardíaco adequado [8,80].

Na presente pesquisa, a PSVD apresentou-se elevada apenas no grupo MCT 14, corroborando com dados já publicados [31,81]. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento da pressão média da artéria pulmonar (PAPm) encontrado nesse mesmo grupo experimental, visto que o aumento da resistência desse vaso, causado pelo remodelamento patológico, é o principal influente na modulação da pós-carga imposta ao VD [22]. Apesar de ambos grupos que receberam MCT apresentarem hiporreatividade da artéria pulmonar, apenas a partir do décimo quarto dia de progressão da doença foi visto um aumento da PAPm, como já foi demonstrado em estudos prévios [28,55]. O resultado da atividade da enzima NADPH oxidase pode estar contribuindo para tal fato, visto que na primeira semana da HAP não houve diferença entre o grupo saudável e o grupo doente, e sua atividade está intimamente relacionada com o remodelamento vascular. O aumento da pós-carga imposta ao VD envolve, também, o aumento do perfil contrátil dos cardiomiócitos como mecanismo adaptativo [22,80]. Corroborando com os resultados apresentados acima e em estudos anteriores, os índices de contratilidade ( $dP/dt_{máx}$ ) e de relaxamento ( $dP/dt_{mín}$ ) do VD de animais do grupo MCT 14 estavam elevados, em relação aos animais controle. Isso indica a necessidade de uma maior força contrátil para que o mesmo volume de sangue seja ejetado perante condições de elevada pós-carga [31].



A PDFVD é resultado da pressão imposta na parede do VD, pelo volume de sangue, no final da diástole. Seu aumento está associado à disfunção dessa câmara, uma vez que não é possível ejetar todo volume sanguíneo [8,22]. Não houve diferença da PDFVD entre os quatro grupos avaliados. Esse resultado corrobora com a pesquisa de Werchan et al (1989) e sugere que, nesse período da HAP, o VD ainda se encontra funcional, apenas tendo desenvolvido uma hipertrofia compensatória ao aumento da pós-carga imposta [31]. O SNA desempenha um importante papel no desenvolvimento da insuficiência cardíaca. A hiperatividade do SNS, que é, primariamente, uma resposta adaptativa, é prejudicial ao coração quando mantida cronicamente, uma vez que promove o desenvolvimento do remodelamento cardíaco e, posteriormente, a disfunção ventricular [82].

Estudos que avaliam o tônus autonômico no vigésimo primeiro dia de desenvolvimento da HAP, em modelo experimental de monocrotalina, constataram que há desbalanço autonômico nos animais doentes, em relação aos animais controle, com elevação do componente simpático (LF) e diminuição da modulação cardíaca pelo componente parassimpático (HF). Sugere-se que esse desbalanço autonômico seja o responsável pela disfunção do VD encontrada nos animais doentes [22,83]. Avaliando os elementos de modulação simpática (LF) e parassimpática (HF), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos MCT e CTR nos dois períodos, 7 e 14 dias, analisados no presente trabalho. A razão LF/HF também se manteve igual entre os grupos experimentais, indicando que não há desbalanço autonômico nessa janela temporal da doença. Isso sustenta o resultado da análise da PDFVD, que também não apresentou diferença entre os grupos, e permite inferir que ainda não é visto quadro de IC do VD durante os primeiros 14 dias da HAP, já que a hiperatividade simpática causa alterações estruturais e disfunção do VD e essas acabam elevando a PDFVD, uma vez que o coração não é capaz de ejetar todo o sangue presente na câmara [84].

## **5. CONCLUSÃO**

Analisando os resultados obtidos nesse protocolo experimental, pode-se dizer que as principais alterações morfométricas, funcionais e hemodinâmicas estão mais evidentes a partir do décimo quarto dia após a aplicação da MCT, caracterizando um quadro de HAP já bem estabelecido. Essas alterações envolvem, inicialmente, a responsividade e estrutura da vasculatura pulmonar, exigindo certas adaptações do VD, porém, grandes alterações funcionais dessa câmara não são vistas nessa janela temporal, indicando que o VD ainda se encontra em

estágio de hipertrofia compensatória inicial e funcional. Dentro do contexto atual, onde a literatura carece de dados sobre as duas primeiras semanas da HAP, demonstra-se a importância do presente estudo, visto que apresentou a fase de instauração e a fase inicial da progressão da doença, porém, mais trabalhos são necessários para confirmar o quadro característico desses dois pontos temporais analisados, e realizar análises complementares, principalmente no âmbito do estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

- [1] N. Galiè, M.M. Hoeper, M. Humbert, A. Torbicki, J.L. Vachiery, J.A. Barbera, M. Beghetti, P. Corris, S. Gaine, J.S. Gibbs, M.A. Gomez-Sanchez, G. Jondeau, W. Klepetko, C. Opitz, A. Peacock, L. Rubin, M. Zellweger, G. Simonneau, A. Vahanian, A. Auricchio, J. Bax, C. Ceconi, V. Dean, G. Filippatos, C. Funck-Brentano, R. Hobbs, P. Kearney, T. McDonagh, K. McGregor, B.A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P.A. Sirnes, M. Tendera, P. Vardas, P. Widimsky, N. Al Attar, F. Andreotti, M. Aschermann, R. Asteggiano, R. Benza, R. Berger, D. Bonnet, M. Delcroix, L. Howard, A.N. Kitsiou, I. Lang, A. Maggioni, J.E. Nielsen-Kudsk, M. Park, P. Perrone-Filardi, S. Price, M.T.S. Domenech, A. Vonk-Noordegraaf, J.L. Zamorano, Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension, *Eur. Heart J.* 30 (2009) 2493–2537. doi:10.1093/eurheartj/ehp297.
- [2] D. Montani, S. Günther, P. Dorfmüller, F. Perros, B. Girerd, G. Garcia, X. Jaïs, L. Savale, E. Artaud-Macari, L.C. Price, M. Humbert, G. Simonneau, O. Sitbon, Pulmonary arterial hypertension, *Orphanet J. Rare Dis.* 8 (2013) 97. doi:10.1186/1750-1172-8-97.
- [3] K.M. Chin, L.J. Rubin, Pulmonary Arterial Hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.* 51 (2008) 1527–1538. doi:10.1016/j.jacc.2008.01.024.
- [4] R. Awdish, H. Cajigas, Definition, epidemiology and registries of pulmonary hypertension, *Heart Fail. Rev.* 21 (2016) 223–228. doi:10.1007/s10741-015-9510-y.
- [5] N. Galiè, M. Humbert, J.-L. Vachiery, S. Gibbs, I. Lang, A. Torbicki, G. Simonneau, A. Peacock, A. Vonk Noordegraaf, M. Beghetti, A. Ghofrani, M.A. Gomez Sanchez, G. Hansmann, W. Klepetko, P. Lancellotti, M. Matucci, T. McDonagh, L.A. Pierard, P.T. Trindade, M. Zompatori, M. Hoeper, 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension, *Eur. Heart J.* 37 (2016) 67–119. doi:10.1093/eurheartj/ehv317.

- [6] D.G. Kiely, C.A. Elliot, I. Sabroe, R. Condliffe, Pulmonary hypertension: diagnosis and management, *Bmj*. 346 (2013) f2028–f2028. doi:10.1136/bmj.f2028.
- [7] D. Chemla, V. Castelain, P. Herve, Y. Lecarpentier, S. Brimiouille, Haemodynamic evaluation of pulmonary hypertension, *Eur. Respir. J.* 20 (2002) 1314–1331. doi:10.1183/09031936.02.00068002.
- [8] H.J. Bogaard, K. Abe, A.V. Noordegma, N.F. Voelkel, The right ventricle under pressure, *Chest*. 135 (2009) 794–804. doi:10.1378/chest.08-0492.
- [9] R.M. Tuder, S.H. Abman, T. Braun, F. Capron, T. Stevens, P.A. Thistlethwaite, S.G. Haworth, Development and Pathology of Pulmonary Hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (2009) S3–S9. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.009.
- [10] A.K.N. Alencar, S.L. Pereira, T.L. Montagnoli, R.C. Maia, A.E. Kümmerle, S.S. Landgraf, C. Caruso-Neves, E.B. Ferraz, R. Tesch, J.H.M. Nascimento, C.M.R. De Sant’Anna, C.A.M. Fraga, E.J. Barreiro, R.T. Sudo, G. Zapata-Sudo, Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats, *Br. J. Pharmacol.* 169 (2013) 953–962. doi:10.1111/bph.12193.
- [11] A. Vonk Noordegraaf, N. Galiè, The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension, *Eur. Respir. Rev.* 20 (2011) 243–253. doi:10.1183/09059180.00006511.
- [12] M.H.M. Hessel, P. Steendijk, B. den Adel, C.I. Schutte, A. van der Laarse, Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat, *AJP Hear. Circ. Physiol.* 291 (2006) H2424–H2430. doi:10.1152/ajpheart.00369.2006.
- [13] F. Haddad, R. Doyle, D.J. Murphy, S.A. Hunt, Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: Pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure, *Circulation*. 117 (2008) 1717–1731. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.653584.
- [14] M.D. McGoon, R.L. Benza, P. Escribano-Subias, X. Jiang, D.P. Miller, A.J. Peacock, J. Pepke-Zaba, T. Pulido, S. Rich, S. Rosenkranz, S. Suissa, M. Humbert, Pulmonary arterial hypertension: Epidemiology and registries, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (2013). doi:10.1016/j.jacc.2013.10.023.
- [15] S. Aggarwal, C. Gross, S. Sharma, J.R. Fineman, S.M. Black, Reactive Oxygen Species in Pulmonary Vascular Remodeling, *Compr. Physiology*. 3 (2013) 1011–34. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.
- [16] F. Ferreira, R. Ferreira, J.A. Duarte, Stress oxidativo e dano oxidativo muscular

- esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico, *Rev. Port. Ciências Do Desporto*. 2007 (2007) 257–275. doi:10.5628/rpcd.07.02.257.
- [17] P.K. Singal, N. Khaper, F. Farahmand, A. Belló-Klein, Oxidative stress in congestive heart failure., *Curr. Cardiol. Rep.* 2 (2000) 206–11. doi:10.1007/s11886-000-0070-x.
- [18] C.M. Deaton, D.J. Marlin, Exercise-associated oxidative stress, *Clin. Tech. Equine Pract.* 2 (2003) 278–291. doi:10.1053/S1534-7516(03)00070-2.
- [19] A.R.L. Ludke, F. Mosele, R. Caron-Lienert, M.F. Ribeiro, W. Partata, S. Llesuy, A.S. Araujo, P. Singal, A. Belló-Klein, Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice., *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 55 (2010) 89–95. doi:10.1097/FJC.0b013e3181c87a9d.
- [20] K. De Angelis, M.S.B. Santos, M.C. Irigoyen, Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular, *Rev. Da Soc. Cardiol. Do Rio Gd. Do Sul.* 3 (2004) 1–7.
- [21] F. Triposkiadis, G. Karayannis, G. Giamouzis, J. Skoularigis, G. Louridas, J. Butler, The Sympathetic Nervous System in Heart Failure. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications, *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (2009) 1747–1762. doi:10.1016/j.jacc.2009.05.015.
- [22] B.G. de Lima-Seolin, R. Colombo, J.H.P. Bonetto, R.B. Teixeira, L.M. Donatti, K.R. Casali, A.E.G. Godoy, I.E. Litvin, P.C. Schenkel, A.S. da Rosa Araujo, A. Belló-Klein, Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance, *Eur. J. Pharmacol.* 798 (2017) 57–65. doi:10.1016/j.ejphar.2016.12.028.
- [23] K.M. Ito, M. Sato, K. Ushijima, M. Nakai, K. Ito, Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (2000) H1786-1795. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009465>.
- [24] I.B. Polonio, M.M.P. Acencio, R. Pazetti, F.M. de Almeida, M. Canzian, B.S. da Silva, K.A.B. Pereira, R. de Souza, Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension, *J Bras Pneumol.* 38 (2012) 452–460. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964929>.
- [25] M.P. Souza-Rabbo, L.F.F. Silva, J.A.S. Auzani, M. Picoral, N. Khaper, A. Belló-Klein, EFFECTS OF A CHRONIC EXERCISE TRAINING PROTOCOL ON OXIDATIVE STRESS AND RIGHT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN MONOCROTALINE-TREATED RATS, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35 (2008) 944–948.

- [26] S.B. Yee, S. Kinser, D. a Hill, C.C. Barton, J. a Hotchkiss, J.R. Harkema, P.E. Ganey, R. a Roth, Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166 (2000) 173–185. doi:10.1006/taap.2000.8968.
- [27] J.G. Gomez-Arroyo, L. Farkas, A.A. Alhussaini, D. Farkas, D. Kraskauskas, N.F. Voelkel, H.J. Bogaard, The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective, *AJP Lung Cell. Mol. Physiol.* 302 (2012) L363–L369. doi:10.1152/ajplung.00212.2011.
- [28] B. Meyrick, W. Gamble, L. Reid, Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 239 (1980) H692–H702.
- [29] F.L. Silva, Adaptação Oxidativa E Funcional Progressiva Do Sistema Cardiopulmonar Secundária À Hipertensão Arterial Pulmonar Em Ratos, (2011) 90.
- [30] F. Farahmand, M.F. Hill, P.K. Singal, F. Farahmand, M.F. Hill, P.K. Singal, Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale, *Mol. Cell. Biochem.* 260 (2004) 21–29.
- [31] P.M. Werchan, W.R. Summer, A.M. Gerdes, K.H. McDonough, Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension., *Am. J. Physiol.* 256 (1989) H1328-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2524170>.
- [32] P. Flecknell, Laboratory animal anaesthesia, Academic Press, 2015.
- [33] L.W. Hu, L.A. Benvenuti, E.A. Liberti, M.S. Carneiro-Ramos, M.L.M. Barreto-Chaves, Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285 (2003) R1473–R1480. doi:10.1152/ajpregu.00269.2003.
- [34] E.A. Silveira, F.D.M. Siman, T. De Oliveira Faria, M.V.A. Vescovi, L.B. Furieri, J.H.F. Lizardo, I. Stefanon, A.S. Padilha, D.V. Vassallo, Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas, *Free Radic. Biol. Med.* 67 (2014) 366–376. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.021.
- [35] K.Z. Nunes, D.O. Nunes, E.A. Silveira, C.A.C. Pereira, G.B.B. Filho, D.V. Vassallo, M. Fioresi, Chronic lead exposure decreases the vascular reactivity of rat aortas: The role of hydrogen peroxide, *PLoS One.* 10 (2015) 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0120965.
- [36] G. Zapata-Sudo, L.B. Pontes, J.S. Da Silva, L.M. Lima, I.K.D.C. Nunes, E.J. Barreiro, R.T. Sudo, Benzenesulfonamide attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial

- hypertension in a rat model, *Eur. J. Pharmacol.* 690 (2012) 176–182. doi:10.1016/j.ejphar.2012.05.043.
- [37] C.L. Sartório, D. Fraccarollo, P. Galuppo, M. Leutke, G. Ertl, I. Stefanon, J. Bauersachs, Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction, *Hypertension*. 50 (2007) 919–925. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.093450.
- [38] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature*. 227 (1970) 680–5. doi:10.1038/227680a0.
- [39] Y. Wei, J.R. Sowers, R. Nistala, H. Gong, G.M.E. Uptergrove, S.E. Clark, E.M. Morris, N. Szary, C. Manrique, C.S. Stump, Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 35137–35146. doi:10.1074/jbc.M601320200.
- [40] J.W. Koskenvuo, R. Mirsky, Y. Zhang, F.S. Angeli, S. Jahn, T.-P. Alastalo, N.B. Schiller, A.J. Boyle, K. Chatterjee, T. De Marco, Y. Yeghiazarians, A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model, *Int. J. Cardiovasc. Imaging*. 26 (2010) 509–518. doi:10.1007/s10554-010-9596-1.
- [41] B. Jespersen, L. Knupp, C.A. Northcott, Femoral Arterial and Venous Catheterization for Blood Sampling, Drug Administration and Conscious Blood Pressure and Heart Rate Measurements, *J. Vis. Exp.* (2012). doi:10.3791/3496.
- [42] D. Baraldi, K. Casali, R.O. Fernandes, C. Campos, C. Sartório, A. Conzatti, G.K. Couto, P.C. Schenkel, A. Belló-Klein, A.R.S. Araujo, The role of AT1-receptor blockade on reactive oxygen species and cardiac autonomic drive in experimental hyperthyroidism, *Auton. Neurosci. Basic Clin.* (2013). doi:10.1016/j.autneu.2013.04.003.
- [43] N. Montano, T.G. Ruscone, A. Porta, F. Lombardi, M. Pagani, A. Malliani, Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt, *Circulation*. 90 (1994) 1826–1831. doi:10.1161/01.CIR.90.4.1826.
- [44] A. Malliani, M. Pagani, F. Lombardi, S. Cerutti, Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain, *Circulation*. 84 (1991) 482–492. doi:10.1161/01.CIR.84.2.482.
- [45] J.M. Kay, P. Harris, D. Heath, Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds, *Thorax*. 22 (1967) 176 LP-179.

<http://thorax.bmj.com/content/22/2/176.abstract>.

- [46] A. Zimmer, R.B. Teixeira, J.H.P. Bonetto, R. Siqueira, C.C. Carraro, L.M. Donatti, A. Hickmann, I.E. Litvin, A.E.G. Godoy, A.S. Araujo, R. Colombo, A. Belló-Klein, Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension, *Mol. Cell. Biochem.* 429 (2017) 73–89. doi:10.1007/s11010-016-2937-1.
- [47] R. Colombo, R. Siqueira, C.U. Becker, T.G. Fernandes, K.M. Pires, S.S. Valença, M.P. Souza-Rabbo, A.S. Araujo, A. Belló-Klein, Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91 (2013) 38–44. doi:10.1139/cjpp-2012-0261.
- [48] A.C. Fernandes, O.M. de P.A. Bezerra, Terapia nutricional na doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações nutricionais, *J. Bras. Pneumol.* 32 (2006) 461–471. doi:10.1590/S1806-37132006000500014.
- [49] L.J. McNABB, K.M. Baldwin, Hemodynamic and metabolic effects of exercise in Crotalaria-induced pulmonary hypertension in rats, *J. Appl. Physiol.* 57 (1984) 1829–1833.
- [50] D. Mueller, L.K. Mahan, S.E. Stump, Terapia clínica nutricional na doença pulmonar, Mahan LK, Stump S E. Krause-Alimentos, *Nutr. E Dietoter.* 10a Ed. São Paulo Roca. (2002) 789–805.
- [51] R.D. Aquino, S.M. Fonseca, E.P.L. Lourenço, A.L. Leite, A.R. De Cássia Bettencourt, Mapeamento dos diagnósticos de enfermagem em uma unidade de pneumologia, *ACTA Paul. Enferm.* 24 (2011) 192–198. doi:10.1590/S0103-21002011000200006.
- [52] R. Nogueira-Ferreira, R. Vitorino, R. Ferreira, T. Henriques-Coelho, Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 35 (2015) 8–16. doi:10.1016/j.pupt.2015.09.007.
- [53] F. Leichsenring-Silva, A.M.V. Tavares, F. Mosele, B. Berger, S. Llesuy, A. Belló-Klein, Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38 (2011) 804–810. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05608.x.
- [54] L. Brown, J. Miller, A. Dagger, C. Sernia, Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats, *J Cardiovasc Pharmacol.* 31 (1998) 108–115. doi:10.1097/00005344-199801000-00016.
- [55] J.C. Lee, Therapeutic effect of prostaglandin E1 in monocrotaline-induced pulmonary

- arterial hypertension rats, *Anat. Cell Biol.* 50 (2017) 60–68.
- [56] R. Huxtable, S. Paplanus, J. Laugharn, The prevention of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy, *CHEST J.* 71 (1977) 308–310.
- [57] M.L. Handoko, F.S. De Man, C.M. Happé, I. Schaliij, R.J.P. Musters, N. Westerhof, P.E. Postmus, W.J. Paulus, W.J. Van Der Laarse, A. Vonk-Noordegraaf, Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension, *Circulation.* 120 (2009) 42–49. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.829713.
- [58] S. Bogdan, A. Seferian, A. Totoescu, S. Dumitrache-Rujinski, M. Ceausu, C. Coman, C.M. Ardelean, M. Dorobantu, M. Bogdan, Sildenafil Reduces Inflammation and Prevents Pulmonary Arterial Remodeling of the Monocrotaline - induced Disease in the Wistar Rats, *Maedica (Buchar).* 7 (2012) 109–116.
- [59] V.M. Da Trindade Nobre, F. Riet-Correa, J.M. Barbosa Filho, A.F. Medeiros Dantas, I.M. Tabosa, J.S. Vasconcelos, Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em equídeos no semi-árido da Paraíba, *Pesqui. Vet. Bras.* 24 (2004) 132–143. doi:10.1590/S0100-736X2004000300004.
- [60] D.W. Wilson, H.J. Segall, L.C. Pan, M.W. Lamé, J.E. Estep, D. Morin, Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity., *Crit. Rev. Toxicol.* 22 (1992) 307–25. doi:10.3109/10408449209146311.
- [61] D.W. Wilson, S.K. Dunston, Progressive Pulmonary Inflammatory Vasculature and Structural Changes of Monocrotaline-Treated in the Rats, *Lung.* 80 (1989) 57–80.
- [62] F.L. Pacagnelli, A. Sabela, A.K. Dias, K. Okoshi, T.B. Mariano, D.H.S. Campos, R.F. Carvalho, A.C. Cicogna, L.C.M. Vanderlei, Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline, *Int. J. Exp. Pathol.* 97 (2016) 238–247.
- [63] A.A. DE ARTIÑANO, V.L.-M. GONZALEZ, Endothelial Dysfunction and Hypertensive Vasoconstriction, *Pharmacol. Res.* 40 (1999) 113–124. doi:10.1006/phrs.1999.0481.
- [64] M.-Y. Lee, K.-B. Tsai, J.-H. Hsu, S.-J. Shin, J.-R. Wu, J.-L. Yeh, Liraglutide prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by suppressing ET-1 and enhancing eNOS/sGC/PKG pathways, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31788. doi:10.1038/srep31788.
- [65] R. Hiram, E. Rizcallah, S. Marouan, C. Sirois, M. Sirois, C. Morin, S. Fortin, E. Rousseau, Resolvin E1 normalizes contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and smooth muscle cell



- migration rate in TNF-alpha- and IL-6-pretreated human pulmonary arteries., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 309 (2015) L776-88. doi:10.1152/ajplung.00177.2015.
- [66] R. Budhiraja, R.M. Tuder, P.M. Hassoun, Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension, *Circulation*. 109 (2004) 159–165.
- [67] J.P. Khoo, L. Zhao, N.J. Alp, J.K. Bendall, T. Nicoli, K. Rockett, M.R. Wilkins, K.M. Channon, Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension, *Circulation*. 111 (2005) 2126–2133.
- [68] E.I. Ozturk, S. Uma, Effects of atorvastatin and L-arginine treatments on electrical field stimulation-mediated relaxations in pulmonary arterial rings of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 56 (2010) 498–505.
- [69] T.C. Resta, R.J. Gonzales, W.G. Dail, T.C. Sanders, B.R. Walker, Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 272 (1997) H806–H813.
- [70] R.C. Tyler, M. Muramatsu, S.H. Abman, T.J. Stelzner, D.M. Rodman, K.D. Block, I.F. McMurtry, Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 20 (1999) 1297.
- [71] F. Seta, M. Rahmani, P. V. Turner, C.D. Funk, Pulmonary oxidative stress is increased in cyclooxygenase-2 knockdown mice with mild pulmonary hypertension induced by monocrotaline, *PLoS One*. 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0023439.
- [72] N. Davie, S.J. Haleen, P.D. Upton, J.M. Polak, M.H. Yacoub, N.W. Morrell, J. Wharton, ET A and ET B receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (2002) 398–405. doi:10.1164/rccm.2104059.
- [73] T.T. Zhang, B. Cui, D.Z. Dai, W. Su, CPU 86017, p-chlorobenzyltetrahydroberberine chloride, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing endothelin pathway, *Acta Pharmacol. Sin.* 26 (2005) 1309–1316. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00214.x.
- [74] T. Ishikawa, M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto, T. Masaki, Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide, *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 413 (1988) 108–110.
- [75] D.J. Stewart, R.D. Levy, P. Cernacek, D. Langleben, Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease?, *Ann. Intern. Med.* 114 (1991)

464–469.

- [76] N. Khaper, S. Bryan, S. Dhingra, R. Singal, A. Bajaj, C.M. Pathak, P.K. Singal, Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure., *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 1033–49. doi:10.1089/ars.2009.2930.
- [77] R.S. Frey, M. Ushio–Fukai, A.B. Malik, NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 791–810. doi:10.1089/ars.2008.2220.
- [78] J. He, X. Li, H. Luo, T. Li, L. Zhao, Q. Qi, Y. Liu, Z. Yu, Galectin-3 mediates the pulmonary arterial hypertension-induced right ventricular remodeling through interacting with NADPH oxidase 4, *J. Am. Soc. Hypertens.* (2016) 1–15. doi:10.1016/j.jash.2017.03.008.
- [79] F. Kamezaki, H. Tasaki, K. Yamashita, M. Tsutsui, S. Koide, S. Nakata, A. Tanimoto, M. Okazaki, Y. Sasaguri, T. Adachi, Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 177 (2008) 219–226.
- [80] E.D. Austin, T. Lahm, J. West, S.P. Tofovic, A.K. Johansen, M.R. Maclean, A. Alzoubi, M. Oka, Gender, sex hormones and pulmonary hypertension., *Pulm. Circ.* 3 (2013) 294–314. doi:10.4103/2045-8932.114756.
- [81] T. Miyauchi, R. Yorikane, S. Sakai, T. Sakurai, M. Okada, M. Nishikibe, M. Yano, I. Yamaguchi, Y. Sugishita, K. Goto, Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension., *Circ. Res.* 73 (1993) 887–897. doi:10.1161/01.RES.73.5.887.
- [82] S. Andersen, A. Andersen, F.S. De Man, J.E. Nielsen-Kudsk, Sympathetic nervous system activation and  $\alpha$ -adrenoceptor blockade in right heart failure, *Eur. J. Heart Fail.* 17 (2015) 358–366. doi:10.1002/ejhf.253.
- [83] H. Gonçalves, T. Henriques-Coelho, J. Bernardes, A.P. Rocha, A. Brandão-Nogueira, A. Leite-Moreira, Analysis of heart rate variability in a rat model of induced pulmonary hypertension, *Med. Eng. Phys.* 32 (2010) 746–752. doi:10.1016/j.medengphy.2010.04.018.
- [84] W.J. Remme, Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 17 (2003) 349–360.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- A aplicação da MCT foi capaz de induzir, com êxito, a HAP.
- Os animais que receberam MCT tiveram redução do ganho de massa corporal, por conta da HAP.
- Não houve congestão hepática em nenhum grupo experimental, entretanto, ambos grupos que receberam MCT apresentaram congestão pulmonar. O desenvolvimento de hipertrofia do VD, por conta do aumento da pós-carga, só foi visto no grupo MCT 14.
- No sétimo dia após administração da MCT, já existe diminuição da resposta vasodilatadora da artéria pulmonar à acetilcolina, possivelmente devido à disfunção endotelial induzida pela MCT. A resposta contrátil à fenilefrina se manteve inalterada.
- As expressões do receptor A de endotelina-1 (ET-A) e da enzima eNOS não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais.
- A enzima NADPH oxidase teve aumento significativo de sua atividade nos animais MCT 14, sugerindo que o estresse oxidativo seja um importante participante da disfunção endotelial e remodelamento vascular.
- Apesar de não serem encontradas diferenças significativas na PDFVD e na FC, foi encontrada importante elevação na PAPm e PSVD, indicando elevação da pós-carga imposta ao VD e piora da função sistólica, características da HAP decorrentes das alterações vasculares.
- A função autonômica não mostrou-se alterada na janela temporal analisada.

A presente pesquisa possui grande relevância no âmbito em questão, visto que pouco é descrito sobre as fases iniciais do desenvolvimento da HAP. Entretanto, mais estudos fazem-se necessários para avaliar outros aspectos com importante papel na progressão da doença. Assim, as perspectivas desse estudo são:

- Aumentar o N amostral em algumas técnicas executadas.
- Analisar a expressão do receptor B da endotelina (ET-B), em amostras de artéria pulmonar, através de Western Blot.
- Realizar ensaios da via da enzima óxido nítrico sintase, a fim de verificar os níveis de NO.

- Avaliar a expressão e atividade de importantes enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GPx, tanto na artéria pulmonar, quanto no VD.
- Mensurar a concentração de ânion superóxido em amostras de artéria pulmonar.
- Discriminar o estado redox nesse período da HAP, através da medida de glutathionas.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S. et al. Reactive Oxygen Species in Pulmonary Vascular Remodeling. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1011–34, 2013.

ALENCAR, A. K. N. et al. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 5, p. 953–962, 2013.

ALVES, J. L. et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: Results from a registry of incident Brazilian cases. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 495–501, 2015.

ANDERSEN, S. et al. Sympathetic nervous system activation and  $\alpha$ -adrenoceptor blockade in right heart failure. **European Journal of Heart Failure**, v. 17, n. 4, p. 358–366, 2015.

ANGELIS, K. DE et al. SOCIEDADE de CARDIOLOGIA do RIO GRANDE DO SUL. **Cardiologia Rome**, v. 33, n. Figura 1, p. 1–7, 2006.

AQUINO, R. D. et al. Mapeamento dos diagnósticos de enfermagem em uma unidade de pneumologia. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 24, n. 2, p. 192–198, 2011.

AUSTIN, E. D. et al. Gender, sex hormones and pulmonary hypertension. **Pulmonary circulation**, v. 3, n. 2, p. 294–314, 2013.

AWDISH, R.; CAJIGAS, H. Definition, epidemiology and registries of pulmonary hypertension. **Heart Failure Reviews**, v. 21, n. 3, p. 223–228, 2016.

BARALDI, D. et al. The role of AT1-receptor blockade on reactive oxygen species and cardiac autonomic drive in experimental hyperthyroidism. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 2013.

BISWAS, S. K.; RAHMAN, I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: The role of glutathione. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 60–76, 2009.

BOGAARD, H. J. et al. The right ventricle under pressure. **Chest**, v. 135, n. 3, p. 794–804, 2009.

BOGDAN, S. et al. Sildenafil Reduces Inflammation and Prevents Pulmonary Arterial Remodeling of the Monocrotaline - induced Disease in the Wistar Rats. **Maedica (Buchar)**, v. 7, n. 2, p. 109–116, 2012.

BROWN, L. et al. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 31, n. 1, p. 108–115, 1998.

BRUM, P. C. et al. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. *Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice*. v. 94305, n. July 2002, p. 1838–1845, 2012.

BUDHIRAJA, R.; TUDER, R. M.; HASSOUN, P. M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 109, n. 2, p. 159–165, 2004.

BUERMANS, H. P. J. et al. Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. **Physiological genomics**, v. 21, n. 10, p. 314–323, 2005.

CASSERLY, B.; KLINGER, J. R. Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. **Drug design, development and therapy**, v. 3, p. 269–87, 2009.

CHEMLA, D. et al. Haemodynamic evaluation of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. 5, p. 1314–1331, 2002.

CHIN, K. M.; RUBIN, L. J. Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 16, p. 1527–1538, 2008.

CHOUDHARY, G.; JANKOWICH, M.; WU, W.-C. Prevalence and Clinical Characteristics Associated with Pulmonary Hypertension in African-Americans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e84264, 2013.

CIARKA, A. et al. Atrial septostomy decreases sympathetic overactivity in pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 131, n. 6, p. 1831–1837, 2007.

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**, v. 91, n. 1, p. 38–44, 2013.

DA TRINDADE NOBRE, V. M. et al. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em equídeos no semi-árido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 3, p. 132–143, 2004.

DAICHO, T. et al. Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 8, p. 1378–1384, 2009.

DAVIE, N. et al. ET A and ET B receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 3, p. 398–405, 2002.

DE ANGELIS, K.; SANTOS, M. S. B.; IRIGOYEN, M. C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 3, p. 1–7, 2004.

DE ARTIÑANO, A. A.; GONZALEZ, V. L.-M. Endothelial Dysfunction and Hypertensive Vasoconstriction. **Pharmacological Research**, v. 40, n. 2, p. 113–124, 1999.

DE LIMA-SEOLIN, B. G. et al. Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance. **European Journal of Pharmacology**, v. 798, p. 57–65, 2017.

DEATON, C. M.; MARLIN, D. J. Exercise-associated oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, n. 3, p. 278–291, 2003.

FARAHMAND, F. et al. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular & Cellular Biochemistry**, v. 260, n. 1–2, p. 21–29, 2004.

FARHAT, M. Y. et al. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. **British journal of pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 719–723, 1993.

FERNANDES, A. C.; BEZERRA, O. M. DE P. A. Terapia nutricional na doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações nutricionais. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 461–471, 2006.

FERREIRA, F.; FERREIRA, R.; DUARTE, J. A. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 2007, n. 2, p. 257–275, 2007.

FLORES, A. S.; MIOTTO, S. T. S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na região sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 245–249, 2005.

FREY, R. S.; USHIO-FUKAI, M.; MALIK, A. B. NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 791–810, 2009.

GALI, N. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European Heart Journal**, v. 30, n. 20, p. 2493–2537, 2009.

GALIÈ, N. et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European Heart Journal**, v. 37, n. 1, p. 67–119, 2016.

GARDINER, M. R.; ROYCE, R.; BOKOR, A. STUDIES ON CROTALARIA CRISPATA , A NEWLY RECOGNISED CAUSE OF KIMBERLEY HORSE DISEASE Cases in horses. v. 89, 1965.

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 4, p. L363–L369, 2012.

GONÇALVES, H. et al. Analysis of heart rate variability in a rat model of induced pulmonary hypertension. **Medical Engineering & Physics**, v. 32, n. 7, p. 746–752, 2010.

GROEPENHOFF, H. et al. Prognostic Relevance of Changes in Exercise Test Variables in Pulmonary Arterial Hypertension. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.

HADDAD, F. et al. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: Pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. **Circulation**, v. 117, n. 13, p. 1717–1731, 2008.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress: Figure 1. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. [s.l.] Oxford University Press, USA, 2015.

HANDOKO, M. L. et al. Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 120, n. 1, p. 42–49, 2009.

HE, J. et al. Galectin-3 mediates the pulmonary arterial hypertension-induced right ventricular remodeling through interacting with NADPH oxidase 4. **Journal of the American Society of Hypertension**, p. 1–15, 2016.

HESSEL, M. H. M. et al. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 5, p. H2424–H2430, 2006.

HIRAM, R. et al. Resolvin E1 normalizes contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and smooth muscle cell migration rate in TNF- $\alpha$ - and IL-6-pretreated human pulmonary arteries. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 309, n. 8, p. L776-88, 2015.

HOEPER, M. M.; GIBBS, J. S. R. The changing landscape of pulmonary arterial hypertension and implications for patient care. **European Respiratory Review**, v. 23, n. 134, p. 450–457, 2014.

HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 6, p. R1473–R1480, 2003.

HUXTABLE, R.; PAPLANUS, S.; LAUGHARN, J. The prevention of monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. **CHEST Journal**, v. 71, n. 2\_Supplement, p. 308–310, 1977.

ISHIKAWA, T. et al. Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 413, n. 1, p. 108–110, 1988.

ITO, K. M. et al. Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 4, p. H1786-1795, 2000.

JARDIM, C.; PRADA, L. F.; SOUZA, R. Definição e classificação da hipertensão pulmonar. **Pulmão RJ**, v. 24, n. 2, p. 3–8, 2015.



JESPERSEN, B.; KNUPP, L.; NORTHCOTT, C. A. Femoral Arterial and Venous Catheterization for Blood Sampling, Drug Administration and Conscious Blood Pressure and Heart Rate Measurements. **Journal of Visualized Experiments**, n. 59, 2012.

KAMEZAKI, F. et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 177, n. 2, p. 219–226, 2008.

KAY, J. M.; HARRIS, P.; HEATH, D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. **Thorax**, v. 22, n. 2, p. 176 LP-179, 1 mar. 1967.

KHAPER, N. et al. Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 7, p. 1033–49, 2010.

KHOO, J. P. et al. Pivotal role for endothelial tetrahydrobiopterin in pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 111, n. 16, p. 2126–2133, 2005.

KIELY, D. G. et al. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. **Bmj**, v. 346, n. apr16 1, p. f2028–f2028, 2013.

KINGMA, I.; TYBERG, J. V; SMITH, E. R. Effects of diastolic transseptal pressure gradient on ventricular septal position and motion. **Circulation**, v. 68, n. 6, p. 1304–1314, 1983.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LAI, Y.-C. et al. Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 115–130, 2014.

LAPA, M. Características clínicas dos pacientes com hipertensão pulmonar em dois centros de referência em São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 3, p. 139–143, 2006.

LEE, J. C. Therapeutic effect of prostaglandin E1 in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rats. **Anatomy & cell biology**, v. 50, n. 1, p. 60–68, 2017.

LEE, M.-Y. et al. Liraglutide prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by suppressing ET-1 and enhancing eNOS/sGC/PKG pathways. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31788, 2016.

LEGUMINOSAE-PAPILIONOIDEAE, C. L.; HOOK, C. Cytogenetic Studies in Mexican Populations of Species of *Ier* and *Soto*, pers. comm.). East Africa and adjacent Madagascar is considered to be the used as human and animal food, as ornamentals and for medicinal purposes. As a result, they are a valuable. p. 343–351, 1991.

LEICHSENRING-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**, v. 38, n. 12, p. 804–810, 2011.

LI, L. et al. Pulmonary arterial hypertension in the USA: an epidemiological study in a large insured pediatric population. **Pulmonary Circulation**, v. 7, n. 1, p. 126–136, 2017.

LING, Y. et al. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: Results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 8, p. 790–796, 2012.

LUDKE, A. R. L. et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 89–95, 2010.

MALENFANT, S. et al. Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension. **Pulm Circ**, v. 3, n. 2, p. 278–293, 2013.

MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482–492, 1991.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 1969.

MCGOON, M. D. et al. Pulmonary arterial hypertension: Epidemiology and registries. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 SUPPL., 2013.

MCNABB, L. J.; BALDWIN, K. M. Hemodynamic and metabolic effects of exercise in Crotalaria-induced pulmonary hypertension in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 57, n. 6, p. 1829–1833, 1984.

MEYRICK, B.; GAMBLE, W.; REID, L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 239, n. 5, p. H692–H702, 1980.

MIYAUCHI, T. et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circulation research**, v. 73, n. 5, p. 887–897, 1993.

MONTANI, D. et al. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 1, p. 97, 2013.

MONTANO, N. et al. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, v. 90, n. 4, p. 1826–1831, 1994.

MUELLER, D.; MAHAN, L. K.; STUMP, S. E. Terapia clínica nutricional na doença pulmonar. **Mahan LK, Stump S E. Krause-Alimentos, nutrição e dietoterapia. 10a ed. São Paulo: Roca**, p. 789–805, 2002.

MURPHY, M. P. et al. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361–366, 2011.

NOBRE, D.; DAGLI, M. L.; HARAGUCHI, M. Crotalaria juncea intoxication in horses. **Veterinary and human toxicology**, v. 36, n. 5, p. 445–448, 1994.

NOGUEIRA-FERREIRA, R. et al. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 35, p. 8–16, 2015.

NUNES, K. Z. et al. Chronic lead exposure decreases the vascular reactivity of rat aortas: The role of hydrogen peroxide. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.

OZTURK, E. I.; UMA, S. Effects of atorvastatin and L-arginine treatments on electrical field stimulation-mediated relaxations in pulmonary arterial rings of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 498–505, 2010.

PACAGNELLI, F. L. et al. Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline. **International journal of experimental pathology**, v. 97, n. 3, p. 238–247, 2016.

PALOMINO, G.; VÁZQUEZ, R. Cytogenetic studies in Mexican populations of species of *Crotalaria* L.(Leguminosae-Papilionoideae). **Cytologia**, v. 56, n. 3, p. 343–351, 1991.

PAN, L. C. Red Blood Cells Augment Transport of Reactive Metabolites of Monocrotaline from Liver to Lung in Isolated and Tandem Liver and Lung Preparations Pretreatment with the mixed function oxidase inhibitor SKF-525A prevented development of pulmonary hypertension. v. 346, p. 336–346, 1991.

PEACOCK, A. J. et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 30, n. 1, p. 104–109, 2007.

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

POLONIO, I. B. et al. Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension. **J Bras Pneumol**, v. 38, n. 4, p. 452–460, 2012.

RABINOVITCH, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 7, p. 2372–2379, 2008.

REMME, W. J. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 17, n. 4, p. 349–360, 2003.

RESTA, T. C. et al. Selective upregulation of arterial endothelial nitric oxide synthase in pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 272, n. 2, p. H806–H813, 1997.

REZNICK, A.; PACKER, L. Oxygen Radicals in Biological Systems Part C. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. 1991, p. 357–363, 1994.

RIGATTO, K. et al. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension. **European Journal of Pharmacology**, v. 713, n. 1–3, p. 89–93, 2013.

SARTÓRIO, C. L. et al. Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. **Hypertension**, v. 50, n. 5, p. 919–925, 2007.

SETA, F. et al. Pulmonary oxidative stress is increased in cyclooxygenase-2 knockdown mice with mild pulmonary hypertension induced by monocrotaline. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

SHUJAAT, A.; MINKIN, R.; EDEN, E. Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD. **International journal of chronic obstructive pulmonary disease**, v. 2, n. 3, p. 273–82, 2007.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.

SILVA, F. L. Adaptação Oxidativa E Funcional Progressiva Do Sistema Cardiopulmonar Secundária À Hipertensão Arterial Pulmonar Em Ratos. p. 90, 2011.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial , radicais livres e envelhecimento. **Rev Bras Geriatr. Gerontol.**, v. 14, n. 1, p. 441–451, 2011.

SILVEIRA, E. A. et al. Low-dose chronic lead exposure increases systolic arterial pressure and vascular reactivity of rat aortas. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 67, p. 366–376, 2014.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25 SUPPL., 2013.

SINGAL, P. K. et al. Oxidative stress in congestive heart failure. **Current cardiology reports**, v. 2, n. 3, p. 206–11, 2000.

SOUZA-RABBO, 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**, v. 35, n. 8, p. 944–948, 2008.

STEWART, D. J. et al. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? **Annals of internal medicine**, v. 114, n. 6, p. 464–469, 1991.

THIENEMANN, F. et al. The causes, treatment, and outcome of pulmonary hypertension in Africa: Insights from the Pan African Pulmonary Hypertension Cohort (PAPUCO) Registry. **International Journal of Cardiology**, v. 221, p. 205–211, 2016.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém de interesse pecuário incerto [Plants experimentally toxic but with unclear livestock interest]. **Plantas tóxicas do Brasil [Toxic plants of Brazil]**, p. 503–506, 2012.

TRIPOSKIADIS, F. et al. The Sympathetic Nervous System in Heart Failure. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 19, p. 1747–1762, 2009.

TUDER, R. M. et al. Development and Pathology of Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 1 SUPPL. 1, p. S3–S9, 2009.

TYLER, R. C. et al. Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 20, n. 2, p. 1297, 1999.

VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 407–415, 2015.

VONK NOORDEGRAAF, A.; GALIÈ, N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Review**, v. 20, n. 122, p. 243–253, 2011.

WEI, Y. et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35137–35146, 2006.

WERCHAN, P. M. et al. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **The American journal of physiology**, v. 256, n. 5 Pt 2, p. H1328-36, 1989.

WILLIAMS, M. C.; MOLYNEUX, R. J. Occurrence, concentration, and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Science**, p. 476–481, 1987.

WILSON, D. W. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Critical reviews in toxicology**, v. 22, n. 5–6, p. 307–25, 1992.

WILSON, D. W.; DUNSTON, S. K. Progressive Pulmonary Inflammatory Vasculature and Structural Changes of Monocrotaline-Treated in the Rats. **Lung**, v. 80, p. 57–80, 1989.

YEE, S. B. et al. Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 173–185, 2000.

YILDIZ, P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1–2, p. 9–16, 2009.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological reviews**, v. 74, n. 1, p. 139–163, 1994.

ZAPATA-SUDO, G. et al. Benzenesulfonamide attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in a rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, n. 1–3, p. 176–182, 2012.

ZHANG, T. T. et al. CPU 86017, p-chlorobenzyltetrahydroberberine chloride, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing endothelin pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 11, p. 1309–1316, 2005.

ZIMMER, A. et al. Effects of aerobic exercise training on metabolism of nitric oxide and endothelin-1 in lung parenchyma of rats with pulmonary arterial hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 429, n. 1–2, p. 73–89, 2017.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA

Regras da revista “Vascular Pharmacology”.



### VASCULAR PHARMACOLOGY

A journal of Vascular Biology and Medicine

#### INFORMATION PACK

AUTHOR

#### TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**



ISSN: 1537-1891

## DESCRIPTION

---

*Vascular Pharmacology* publishes papers, which contains results of all aspects of **biology** and **pharmacology** of the **vascular system**.

Papers are encouraged in basic, translational and clinical aspects of Vascular Biology and Pharmacology, utilizing approaches ranging from **molecular biology** to **integrative physiology**. All papers are in English.

The Journal publishes review articles which include vascular aspects of **thrombosis, inflammation, cell signalling, atherosclerosis, and lipid metabolism**.

### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#) .

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

[backbanner.gifScienceDirect Backfiles](#)

## AUDIENCE

---

Researchers in pharmacology, clinical pharmacology and kinetics and metabolism studies related to drug action.

## IMPACT FACTOR

---

2015: 2.500 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Embase  
Pubmed  
Science Direct  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief:*

**Raffaele De Caterina**, Chair and Postgraduate School of Cardiology and University Cardiology Division, Università degli Studi "G. d'Annunzio" - Chieti-Pescara, Ospedale SS. Annunziata - Via dei Vestini, 66013, Chieti, Italy, Fax: +39-0871-402817

### *Associate Editors:*

**Jeremy Pearson**, British Heart Foundation, London, England, UK

**Gerard Pasterkamp, MD, PhD**, Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMC Utrecht), Utrecht, Netherlands

**Joseph Michael Miano**, University of Rochester Medical Center, Rochester, New York, USA

### *Special Content Editor:*

**D. Hilfiker-Kleiner**, Hannover Medical School (MHH), Hannover, Germany



**Managing Editor:**

**R. Madonna**, University G.D'Annunzio, Chieti, Italy

**Editorial Board:**

**Christian Aalkjaer**, Aarhus C, Denmark

**Lina Badimon**, Barcelona, Spain

**William Beierwaltes**, Detroit,  
Michigan, USA

**Judith Berliner**, Los Angeles,  
California, USA

**Eduardo Bossone**, Amalfi  
Coast, Italy

**Ralf Brandes**, Frankfurt, Germany

**Lisa A. Cassis**, Lexington, Kentucky, USA

**John Chapman**,  
Paris, France

**Guiseppe Cirino**,  
Napoli, Italy

**Francesco**

**Cosentino**, Rome,  
Italy

**Jozef Dulak**,

Krakow, Poland

**Costanza Emanuelli**, Bristol, England, UK

**Ulf Eriksson**, Stockholm,

Sweden

**Michel Félétou**,

Suresnes, France

**Ingrid**

**Fleming**, Frankfurt,

Germany

**Chris Garland**,

Oxford, UK

**Yong-Jian Geng**, Houston,

Texas, USA

**Catherine**

**Hedrick**, La Jolla, California,

USA

**Timothy Hla**, New York,

New York, USA

**John Horowitz**, Adelaide, South Australia, Australia

**Ulrich Laufs**, Homburg, Germany

**Peter Libby**, Boston,

Massachusetts, USA

**Douglas Losordo**, Chicago,

Illinois, USA

**Nikolaus**

**Marx**, Aachen, Germany

**Thomas Michel**, Boston,

Massachusetts, USA

**Salvador**

**Moncada**, Manchester, UK

**Henning Morawietz**, Dresden,

Germany

**Rama Natarajan**,

Duarte, California, USA

**Stylianos Orfanos**, Haidari-

Athens, Greece

**Sampath Parthasarathy**, Orlando, Florida, USA

**Jun Ren**, Laramie, Wyoming, USA

**Gregg Rokosh**, Louisville, Kentucky, USA

**Bernhard Schieffer**, Marburg, Germany

**Ann Marie Schmidt**, New York, New York, USA

**Tommaso Simoncini**, Pisa, Italy

**Michael Simons**, New Haven, Connecticut, USA

**Sergey Smirnov**, Bath, UK

**Johannes Waltenberger**, Münster, Germany

**Robert Widdop**, Clayton, Victoria, Australia

**Johann Wojta**, Vienna, Austria

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

### **INTRODUCTION**

*Vascular Pharmacology* publishes papers, written in English, which contain results of all aspects of biology and pharmacology of the vascular system.

Papers are encouraged in all areas, including angiogenesis, growth factors, nitric oxide, cell signaling, vasoactive mediators, hypertension, atherosclerosis, metabolic diseases, blood element-vessel wall interactions, thrombosis, micro-circulation, vascular developmental biology and remodeling, vascular inflammation and immunity. Papers are encouraged on pharmacological research utilizing approaches ranging from molecular biology to integrative physiology.

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

It is essential to give a fax number and e-mail address when submitting a manuscript.

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

**Authors are encouraged to submit video material or animation sequences** to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

### *Fast processing option*

If your article has previously been rejected from another journal, the Editors can process your submission to *Vascular Pharmacology* more quickly if the previously received reviewer's comments are made available to them. Please note that these will have to be sent (by email) by the Editor(s) of the respective other journal, we do not accept reviewer's comments submitted from the authors themselves. For questions please contact [vph@elsevier.com](mailto:vph@elsevier.com).

### *Types of paper*

The Journal publishes invited reviews and regular research articles. Sponsored supplements and special issues or collections of papers on the same subject are also published, and can be arranged through negotiation with the Editor.

### **Author Checklist for Research Manuscripts**

Authors, before submission of their manuscript to *Vascular Pharmacology*, and Reviewers who handle manuscripts for *Vascular Pharmacology*, should consider this [checklist](#). The list is designed to encourage best practice in publication. Failure to take account of any item on this list of relevance to the submitted manuscript is likely to lead

to requests for revision of the work or, at worst, rejection.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal

requirements For further information, visit our [Support Center](#).

#### **BEFORE YOU BEGIN**

##### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

##### **Human and animal rights**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

##### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential

conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/ registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the

sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

#### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

##### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

##### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

#### *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

*Elsevier Publishing Campus*

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

#### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

#### **Referees**

**Please suggest 4 potential reviewers for this submission. At least 2 of the suggested reviewers should be located in the USA or Europe.**

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

#### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

#### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

#### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the

relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and

family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

The abstract should have 100-200 words.

#### *Graphical abstract*

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

#### **Keywords**

*Keywords.* Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### *Chemical compounds*

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the [PubChem CID](#) of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

[More information.](#)

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### *Acknowledgements*

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title



or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### *Formatting of funding sources*

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### *Nomenclature and units*

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry](#) for further information.

#### *Footnotes*

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

## **Artwork**

#### *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### *Text graphics*

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately

(e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/vascular-pharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### *Reference style*

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

*Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **RESEARCH DATA**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can

directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

#### *Mendeley data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

#### *Transparency*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. If you submit [this form](#) with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect.

#### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### **Interactive plots**

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

#### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier |  
<http://www.elsevier.com>