

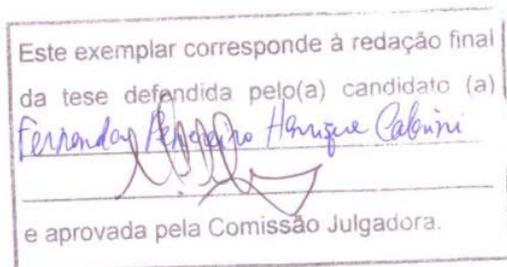
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Fernanda Penereiro Henrique Cabrini**

“Implantação do modelo de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. Avaliação Eletrocardiográfica”



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr Miguel Arcanjo Áreas

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**C112i**

Cabrini, Fernanda Penereiro Henrique  
Implantação do modelo de hipertensão arterial pulmonar  
induzida por monocrotalina em ratos. Avaliação  
eletrocardiográfica / Fernanda Penereiro Henrique Cabrini.  
– Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Miguel Arcanjo Areas.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hipertensão pulmonar. 2. Monocrotalina. 3.  
Eletrocardiografia. 4. Coração - Hipertrofia. 5.  
Reatividade vascular. I. Areas, Miguel Arcanjo, 1952-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.  
III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** A proposal of monocrotaline-induced pulmonary hypertension model in rats: electrocardiogram analysis.

**Palavras-chave em inglês:** Pulmonary hypertension; Monocrotaline; Electrocardiography; Heart - Hypertrophy; Vascular reactivity.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Miguel Arcanjo Areas, Dora Maria Grassi-Kassisse, Felix Guillermo Reyes Reyes.

**Data da defesa:** 16/03/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 13 de março de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

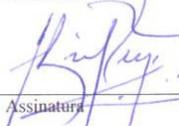
Prof. Dr Miguel Arcanjo Áreas (Orientador)

  
Assinatura

Prof. Dra Dora Maria Grassi-Kassisse

  
Assinatura

Prof. Dr Felix Guillermo Reyes Reyes

  
Assinatura

Prof. Dr Heitor Moreno Junior

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dra Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## **Dedicatória:**

Dedico este trabalho a meus pais, Maria Isabel e Nivaldo, que me proporcionaram oportunidade de escolha e sempre fizeram o melhor para a minha formação pessoal e intelectual. Nunca mediram esforços para me oferecer condições de realizar os meus ideais e sempre estiveram ao meu lado, me apoiando nas minhas decisões. Amo vocês.

Dedico a minha mãe: foram tantas orações... e ao mesmo tempo tantos agradecimentos...

Ela sempre esteve ao meu lado, acreditando no neste sonho e na minha capacidade de realizá-lo. Amo você.

Dedico ao meu marido, Evandro, que também esteve comigo desde o início desta caminhada, trazendo incentivo e consolo nas horas em que tudo parecia não caminhar muito bem, ao mesmo tempo em que também se realizava frente as minhas conquistas a cada etapa do trabalho concluída. Amo você.

E por fim, dedico ao meu irmão, Luis Fernando, que sempre me apoiou nas decisões que tomei até hoje na minha vida, começando da minha escolha profissional em cursar Graduação em Educação Física. Amo você.

## **Agradecimentos**

Especialmente a Deus, pela força e garra diante das dificuldades encontradas ao longo de minha formação, e pela coragem e fé que me fizeram acreditar em meus sonhos, bem como correr atrás para realizá-los.

Ao Professor Dr Miguel Arcanjo Áreas, meu orientador do coração, a quem devo minha admiração e respeito. “Ser supremo”, que me ofereceu muito mais que oportunidade, concedendo-me confiança e acima de tudo seu respeito, ensinando ciência e também experiências de vida. Agradeço a paciência durante esta etapa de minha caminhada, e o incentivo para as próximas que ainda virão, pois você é muito mais que um orientador, é educador e amigo, que contribuiu muito para a minha formação profissional e pessoal. Agradeço também as horas de descontração e muitas risadas. Muito obrigada.

Á minha sogra, Maria, que também torceu muito para que eu chegasse onde cheguei e que sempre mostrou interesse para que eu alcançasse esse sonho e o realizasse. Acima de tudo, agradeço o incentivo em todos os momentos desta caminhada. Muito Obrigada.

Ao meu tio Júlio César, que desde o início me incentivou na realização deste sonho. Muito obrigada.

A todos os meus familiares, que também sempre torceram por mim e acreditaram que eu era capaz. Muito obrigada.

Á Profa Dra Dora Maria Grassi-Kassisse que cedeu livre acesso aos equipamentos e espaço físico do LABEEST, mostrando-se solícita e interessada na realização desta pesquisa. Muito obrigada.

À Profa Dra Regina Célia Spadari, pela concessão do uso do eletrofisiógrafo, equipamento primordial para a realização do experimento da reatividade vascular feito neste trabalho. Muito obrigada.

À Alexandra e o Ivo, secretários do departamento de Fisiologia, pela paciência e dedicação no fornecimento muitos artigos científicos que possibilitaram a realização desta pesquisa. Muito obrigada.

Aos amigos de laboratório Brígida, Luis e Gustavo, Marcelo e Francisco, que não mediram esforços para ajudar em todos os experimentos e análises. E também pelos momentos de descontração. Essa ajuda foi extremamente importante para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada.

Às minhas amigas: Ciça, Daniela, Carmem, Cris, Beatriz, Bianca, Juliana, Veridiana, Fernanda, Ana Paula e Cristiane, que sempre me incentivaram, ajudaram e torceram por mim durante esta caminhada. O apoio de vocês foi importante. Muito obrigada.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	Pag. VIII
<b>Abstract</b>	Pag. IX
<b>Lista de Abreviaturas</b>	Pag. X
<b>Lista de Tabela e Figuras</b>	Pag. XII
<b>I. Introdução</b>	Pag. 1
<b>II. Objetivos</b>	Pag. 9
<b>III. Materiais e Métodos</b>	Pag. 10
III.1 Animais	Pag. 10
III.2 Grupos Experimentais	Pag. 10
III.3 Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar	Pag. 11
III.4 Peso dos animais e órgãos	Pag. 11
III.5 Parâmetros morfológicos	Pag. 11
III.6 Parâmetros eletrocardiográficos	Pag. 12
III.7 Determinação da Pressão Arterial – método direto	Pag. 12
III.8 Preparação dos anéis de artéria aorta e pulmonar isoladas	Pag. 13
III.9 Obtenção de curvas concentração-efeito	Pag. 13
III.10 Drogas e reagentes	Pag.14
III.11 Análise estatística dos resultados	Pag. 15
<b>IV. Resultados e Discussão</b>	Pag. 16
IV.1 Peso corpóreo e de órgãos	Pag. 16
IV.2 Parâmetros morfológicos	Pag. 23
- IV.2.1 Morfologia Hepática	Pag. 23
- IV.2.2 Morfologia Pulmonar	Pag. 26
- IV.2.3 Morfologia Cardíaca	Pag. 33
IV.3 Parâmetros eletrocardiográficos (ECG)	Pag. 40
IV.4 Pressão arterial sistólica (PS), diastólica (PD) e média (PAM)	Pag. 51
IV.5 Reatividade vascular das artérias pulmonar e aorta	Pag. 53
<b>V. Conclusões</b>	Pag. 62
<b>VI. Bibliografia</b>	Pag. 63

## Resumo

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma doença cardiopulmonar caracterizada pelo aumento da resistência dos vasos pulmonares, progredindo para um aumento na pressão arterial pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito, prejudicando a função pulmonar, no que diz respeito à perfusão dos gases. Este quadro pode levar à falência cardíaca. A HAP pode ser induzida em animais com administração de Monocrotalina (MCT), substância que exerce sua toxicidade em poucos dias. Com relação à função cardíaca, a HAP torna o coração menos eficiente em suprir as necessidades metabólicas do organismo, acarretando em outras anormalidades como a redução da tolerância ao exercício e a diminuição do condicionamento físico, comprometendo, assim, a qualidade de vida. Além disso, o principal fator relacionado à fisiopatologia de HAP é a disfunção endotelial, com aumento na produção e liberação de substâncias vasoconstritoras e diminuição da produção e liberação de substâncias vasodilatadoras. Este trabalho teve por objetivo implantar o modelo experimental de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina em ratos Wistar machos adultos no laboratório cardiovascular de esforço, através da determinação da atividade elétrica cardíaca pelo registro do eletrocardiograma, da pressão arterial sistêmica, da reatividade vascular e da histologia cardíaca, pulmonar e hepática. Os animais tratados com monocrotalina apresentaram aumento do peso relativo cardíaco e pulmonar, aumento da espessura arterial pulmonar, hipertrofia ventricular direita, megalocitose hepática, redução do peso corpóreo, alterações eletrocardiográficas indicativas de risco de morte súbita, redução da pressão arterial média e diminuição da resposta máxima à noradrenalina da artéria pulmonar. Esses resultados permitiram concluir que esses animais tornaram-se portadores de HAP estabelecendo-se, portanto, um modelo para estudos de intervenções terapêuticas relativas a essa doença.

Palavras-chave: Hipertensão Arterial Pulmonar, Monocrotalina, Reatividade Vascular, Hipertrofia Cardíaca e ECG.

## **Abstract**

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a life-threatening, progressive disorder of pulmonary blood vessels leading to an increase in pressure in pulmonary artery, that ultimately causes right ventricle heart failure with a lethal outcome. PAH can be induced, in animals, pharmacologically, by Monocrotaline (MCT) administration, which exerts its toxic effects in a few days. With regard to cardiac function, PAH makes the heart less efficient, resulting in abnormalities such as exercise intolerance and physical fitness decline, therefore, quality of life impairment. Moreover, the main factor related to the pathophysiology of PAH is endothelial dysfunction, leading to an increase in production and release of vasoconstrictor substances and reduction in production and release of vasodilators substances. The purpose of this study was to propose a Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension model in Wistar male rats, through Electrocardiogram (ECG) analysis, mean arterial blood pressure, vascular reactivity technique; and cardiac, pulmonary and hepatic morphology. Animals treated with monocrotalina showed increased relative weight of heart and lung, increased pulmonary artery thickness, right ventricular hypertrophy, megalocytosis liver, decrease body weight, electrocardiographic changes indicative of risk of sudden death, reduction of mean arterial pressure and decreased maximum response to norepinephrine artery lung. These results showed that these animals become carriers of PAH-setting is therefore a model for studies of therapeutic interventions for this disease.

**Key Words:** Pulmonary Arterial Hypertension, Monocrotaline, Vascular Reactivity, Cardiac Hypertrophy and ECG.

## Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
Ca <sub>2+</sub>	íon Cálcio
CCE	Curva concentração-efeito
CO ACh	Rato controle – reatividade para a acetilcolina
CO HNO	Rato controle – reatividade para o Sal de Angelis
CO NA	Rato controle – reatividade para a noradrenalina
EC <sub>50</sub>	Concentração molar do agonista que determina resposta igual a 50% da resposta máxima
ECG	Eletrocardiograma
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ET-1	Endotelina do tipo 1
GTN	Gliceril trinitrato
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HNO ou AS	Sal de Angelis
K <sup>+</sup>	Íon potássio
LDH	Lactato desidrogenase
MCT	Monocrotalina
MCTP	Monocrotalina pirrole
MT	Ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina

MT ACh	Ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina – reatividade para a acetilcolina
MT HNO	Ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina – reatividade para o sal de angelis
MT NA	Ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina – reatividade para a noradrenalina
NA	Noradrenalina
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NO	Óxido Nítrico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pD <sub>2</sub>	Logarítmo negativo da concentração molar do agonista que determina resposta igual a 50% da resposta máxima
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
R <sub>máx</sub>	Resposta máxima
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SNP	Nitroprussiato de sódio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## Lista de tabela e figuras

**Tabela 1.** Peso corpóreo (inicial e final) dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO x MT (peso corpóreo final); ( $n = 10$ ).

Pg. 18

**Figura 1.** Variação de peso corpóreo, ao final do período experimental, dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO x MT (peso corpóreo final); ( $n = 10$ ).

Pg 18

**Figura 2.** Peso relativo do fígado (g/100g peso corpóreo) dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO x MT, (ns) não significativo; ( $n = 10$ ).

Pg. 21

**Figura 3.** Peso relativo dos pulmões (g/100g peso corpóreo) dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO x MT; ( $n = 10$ ).

Pg. 21

**Figura 4.** Peso relativo do coração e câmaras cardíacas (g/100g peso corpóreo) dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina,

dose única e subcutânea (60mg/Kg). Sendo: controle coração (CCO); monocrotalina coração (MCO); controle ventrículo direito (CVD); monocrotalina ventrículo direito (MVD), controle ventrículo esquerdo (CVE), monocrotalina ventrículo esquerdo (MVE). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey ; ( $p < 0,05$ ): (a) CCO X MCO, (b) CVE X CVD, (c) CVD X MVD, (d) CVE X MVE, (e) CVE X MVD, (ns) não significativo; (n = 10).

Pg. 22

**Figura 5.** Fotomicrografia do fígado de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Observam-se hepatócitos com um ou dois núcleos com tamanhos equivalentes (a) e sinusóides (b) onde se encontram células de Kupfer (c) de formato alongado caracterizando um tecido normal (CO). Notam-se hepatócitos aumentados com alterações citoplasmáticas (d), núcleos de formas e tamanhos irregulares (e), hepatócitos com granulações citoplasmáticas e nucleares atípicas sugestivas de processo apoptótico (f). H.E. 40 X.

Pg. 25

**Figura 6.** Fotomicrografia do tecido pulmonar de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Observam-se alvéolos íntegros (a) ocupando a maior parte do parênquima pulmonar caracterizando um tecido normal (CO-1 e CO-2) e predominância de tecido extra-alveolar com redução aparente da área alveolar (b) no grupo MT (MT-1; MT-2). H.E. 5 X (CO-1; MT-1); 20 X (CO-2; MT2).

Pg. 28

**Figura 7.** Fotomicrografia de artéria do parênquima pulmonar com hipertrofia da túnica média (a), espessamento fibroso da adventícia (b) e redução do lúmen (c) do grupo com hipertensão arterial pulmonar (MT), em relação ao grupo controle (CO) que apresenta estruturas e dimensões arteriais normais. A HAP foi induzida

por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). H.E.20X Pg. 30

**Figura 8.** Fotomicrografia do tecido pulmonar de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de Hipertensão arterial pulmonar induzida (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se bronquíolo (a) e alvéolos (b) aparentemente normais (CO). Nota-se infiltração leucocitária (c) adjacente a bronquíolos (b) e alvéolos (c) nos animais tratados com monocrotalina (MT). H.E. 20 X. Pg. 32

**Figura 9.** Fotomicrografia de corte longitudinal do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente (a) e feixes de fibras íntegras (b). HE. 40 X. Pg. 34

**Figura 10.** Fotomicrografia de corte transversal do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente (a) e feixes de fibras íntegras (b). HE. 40 X. Pg. 35

**Figura 11.** Fotomicrografia de corte longitudinal do ventrículo direito de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente (a) e feixes de fibras íntegras (b) com aumento da espessura no grupo MT (c). HE. 40 X. Pg. 36

**Figura 12.** Fotomicrografia de corte transversal do ventrículo direito de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por

administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente (a) e feixes de fibras íntegra (b) com aparente aumento do diâmetro do cardiomiócito no grupo MT (c). HE. 40 X.

Pg. 37

**Figura 13.** Área dos cardiomiócitos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Sendo: controle ventrículo direito (CO VD); monocrotalina ventrículo direito (MT VD); controle ventrículo esquerdo (CO VE); monocrotalina ventrículo esquerdo (MT VE),. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey ; ( $p < 0,05$ ): (a) CO VD X MT VD, (b) CO VE X MT VE, (ns) não significativo; n = 5.

Pg. 38

**Figura 14.** Frequência Cardíaca (batimentos por minuto) dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; (n = 10).

Pg. 44

**Figura 15.** Amplitude da onda P dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; Teste t de Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; (n = 10).

Pg. 45

**Figura 16.** Duração do Complexo QRS dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de

monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t e Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; Pg. 47

**Figura 17.** Eixo Elétrico Ventricular (SÂQRS) no plano frontal dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste de Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; (n = 10). Pg. 49

**Figura 18.** Intervalos QT (A) e QTc (B) dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; (n = 10). Pg. 50

**Figura 19.** Pressão arterial sistólica (OS), diastólica (PD) e média (PAM) dos animais dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT), ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO-PS X MT-PS, (b) CO-PD X MT-PD, (c) CO-PAM X MT-PAM, (ns) não significativo; (n = 10). Pg. 52

**Figura 20.** CCE a: (a) ACh ( $10^{-10} - 10^{-4}$ M) e ao (b) HNO ( $10^{-10} - 10^{-5}$ M) de anéis de artéria pulmonar isolada, pré contraídos com noradrenalina ( $10^{-6}$  M), de ratos controle (CO = ●) e portadores de HAP (MT = ○). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso

corpóreo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT. ( $n = 6$ ). O painel (c) apresenta os valores  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x}$  obtidos nos ensaios de reatividade vascular da artéria pulmonar a ACh e ao HNO. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) CO ACh x CO HNO, (b) CO ACh x MT ACh, (c) CO HNO x MT HNO e (d) MT ACh x MT HNO; ( $n = 6$ ).

Pg. 56

**Figura 21.** CCE a: (a) ACh ( $10^{-10} - 10^{-4}M$ ) e ao (b) HNO ( $10^{-10} - 10^{-5}M$ ) de anéis de aorta isolada, pré contraídos com noradrenalina ( $10^{-6} M$ ), de ratos controle (CO =  $\bullet$ ) e portadores de HAP (MT =  $\circ$ ). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT; ( $n = 6$ ). O painel (c) apresenta os valores  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x}$  obtidos nos ensaios de reatividade vascular da aorta a ACh e ao HNO. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) CO ACh x CO HNO, (b) CO ACh x MT ACh, (c) CO HNO x MT HNO e (d) MT ACh x MT HNO; ( $n = 6$ ).

Pg. 57

**Figura 22.** CCE a (a) NA - noradrenalina ( $10^{-10} - 10^{-4}M$ ) de anéis de artéria pulmonar isolada de ratos controle (CO =  $\blacklozenge$ ) e portadores de HAP (MT =  $\nabla$ ). A HAP foi induzida por monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t Student; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT; ( $n = 6$ ). O painel (b) apresenta os valores  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x}$  obtidos nos ensaios de reatividade vascular da aorta a NA. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t Student; ( $p < 0,05$ ): (e) CO x MT; ( $n = 6$ ).

Pg. 59

**Figura 23.** CCE a (a) NA - noradrenalina ( $10^{-10} - 10^{-4}M$ ) de anéis de aorta isolada de ratos controle (CO =  $\nabla$ ) e portadores de HAP (MT =  $\blacklozenge$ ). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso

corpóreo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t Student; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT. ( $n = 6$ ). O painel **(b)** apresenta os valores  $pD_2$  e  $R_{m\acute{a}x}$  obtidos nos ensaios de reatividade vascular da aorta a NA. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t Student; ( $p < 0,05$ ): (e) CO x MT. ( $n = 6$ ).

Pg. 60

## I. INTRODUÇÃO

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é caracterizada pelo aumento da pressão na parede da artéria pulmonar, decorrente do aumento da resistência vascular pulmonar, que leva ao aumento da sobrecarga cardíaca no ventrículo direito. De acordo com McLaughlin et al. (2006) e Said et al. (2006), valores de pressão na artéria pulmonar em humanos acima de 25 mmHg, caracterizam a doença que pode ser desenvolvida por pré-disposição genética, doenças coexistentes ou exposição a fatores ambientais.

Esta doença resulta em mudanças compensatórias no lado direito do coração, ou seja, um remodelamento cardiovascular para suportar o aumento da carga de trabalho imposta à musculatura cardíaca, progredindo para uma hipertrofia compensatória do ventrículo direito. Tal fato limita a capacidade física do indivíduo, diminuindo a sua qualidade de vida (Coats et al., 1992; Mereles et al., 2006).

Com relação à pressão arterial sistêmica, Werchan et al. (1989) não observaram alterações significativas em animais portadores dessa doença. Por outro lado, Ishikawa et al. (1995), Seyfarth et al. (2000) e Chen et al. (2001) verificaram redução da pressão arterial média nesse modelo experimental. Entretanto, Lamberts et al (2007), demonstraram um aumento da pressão diastólica ventricular esquerda de ratos com HAP, como resultado do aumento do volume do ventrículo direito.

Segundo Velez Roa et al. (2004), a HAP tem relação direta com o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático, sendo parcialmente mediada pelo reflexo quimiorreceptor devido à redução da concentração de oxigênio no sangue. Assim, além do remodelamento vascular e do aumento do trabalho da musculatura cardíaca, verifica-se também diminuição da saturação de oxigênio arterial e venoso conseqüente à disfunção pulmonar, fato que implica numa resposta fisiológica vasoconstritora para ajustar o fluxo sanguíneo pulmonar para as áreas de baixa ventilação devido a liberação de fatores constritores derivados do endotélio ao mesmo tempo em que os fatores relaxantes encontram-

se reduzidos (Tagaya et al., 2001). Este fato constitui-se numa das causas da HAP (Favret et al., 2001; Goret et al., 2005).

Além disso, pacientes com HAP apresentam disfunção endotelial pulmonar, caracterizada pela diminuição da expressão da NO-sintase endotelial (eNOS), enzima presente nas células endoteliais com conseqüente diminuição da síntese e liberação de NO pelo endotélio dos vasos pulmonares (Hongo et al., 2005; McLaughlin e McGoan, 2006). O NO, inicialmente descrito por Furchgott e Zawadski (1980) como fator de relaxamento derivado do endotélio, é a principal substância vasodilatadora endotelial.

Outras substâncias vasodilatadoras e anti-proliferativas produzidas pelo endotélio encontram-se reduzidas nesta doença, como a prostaciclina ( $PGI_2$ ), por exemplo. Além disso, animais com HAP induzida por MCT, apresentaram diminuição da produção do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), o que aumenta o estímulo para despolarização da célula muscular lisa vascular e conseqüente vasoconstrição. Somado a isso, verifica-se, também, a inibição de canais de  $K^+$  voltagem-dependentes (McLaughlin e McGoan, 2006) e diminuição de canais  $Na^+/K^+$  presentes na membrana da célula muscular lisa vascular, diminuindo a magnitude do relaxamento atribuído ao efluxo do  $K^+$  (Shubat et al., 1989). Post et al. (1992), realçaram que a inibição das correntes de  $K^+$  na artéria pulmonar prejudicava a modulação do tônus vasomotor pulmonar na HAP induzida por hipóxia. Além disso, a diminuição das correntes de potássio estimula, por sua vez, a despolarização da musculatura lisa vascular aumentando o tônus vasoconstritor de animais portadores de HAP (Ito et al., 2000).

Verifica-se ainda nesta doença, aumento da liberação endotelial de substâncias, tais como: a) endotelina 1 substância vasoconstritora e com ação mitogênica indutora de proliferação celular da musculatura lisa vascular (Goret et al., 2005 e McLaughlin e McGoan., 2006); b) tromboxana ( $A_2$ ) substância vasoconstritora, promove, também, adesão plaquetária e trombos vasculares (Barreto et al., 2005; Said et al., 2006); c) fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que atua no desenvolvimento e maturação pulmonar e proteção das células endoteliais, mas que em altas concentrações, causa lesões plexiformes

pulmonares, ou seja, extravasamento de líquido celular e migração leucocitária, causando inflamação (Said et al., 2006); d) fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), responsável pela adesão plaquetária e mitogênese (Barreto et al., 2005 e Said et al., 2005).

Além disso, no caso da HAP por pré-disposição genética, verifica-se mutação no gene *BMPR2*, o qual, em condições normais, estimula receptores  $TGF\beta$  responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular, tanto no período embrionário quanto na maturação dos tecidos já formados. Dessa forma, a mutação deste gene favorece o efeito pró-apoptótico das células do endotélio pulmonar, aumentando o risco do desenvolvimento da HAP (Barreto et al., 2005; Said et al., 2006).

Kanno et al. (2001), chamaram a atenção para a proteína p21 presente nos pulmões e vasos sanguíneos pulmonares, que tem sua síntese e liberação estimulada pelo NO endotelial, cuja função é inibir a proliferação da célula muscular lisa. Na HAP, onde se tem uma diminuição na síntese e liberação de NO, a p21 não é ativada, sendo um agravante para o remodelamento vascular.

As mudanças funcionais induzidas pela HAP no sistema cardiopulmonar do rato ocorrem semelhantemente àquelas observadas em humanos (Pelá et al., 1990). Nesses animais, a HAP pode ser induzida a partir de injeção de monocrotalina (MCT), em dose única por via subcutânea. A MCT é uma substância alcalóide, sintetizada quimicamente e encontrada em folhas e sementes da planta *Crotalaria spectabilis*, (Bruner et al., 1983; Thomas et al., 1998; Favret et al., 2001).

Segundo Bruner et al. (1983) e Taylor et al. (1996), após sua administração, a MCT é metabolizada pelo fígado e transformada em monocrotalina pirrole (MCTP), sua forma ativa, que em 28 dias já exerce sua toxicidade no sistema cardiopulmonar do rato. De acordo com Kanno et al. (2001), Barreto et al. (2005) e Said et al. (2006), o principal fator relacionado à fisiopatologia da HAP induzida por MCT é a disfunção endotelial, seguida de remodelamento vascular pulmonar.

O efeito tóxico da MCT no rato é caracterizado por edema pulmonar, ascite e fibrose, já que este modelo animal também apresenta aumento nas

concentrações plasmáticas de angiotensina II, substância responsável pelo aumento do conteúdo de colágeno no tecido cardíaco e pulmonar (Brown et al., 1998; Lourenço et al., 2006; Lamberts et al., 2007). Esse modelo animal também apresenta inflamação pulmonar, diminuindo a capacidade deste órgão juntamente com os rins de eliminar a ET-1 em excesso do sangue e pulmões, aumentando ainda mais a concentração dessa substância altamente vasoconstritora na circulação (Miyachi et al., 1993 e Barreto et al., 2005). Também são observadas adesão plaquetária nas células endoteliais pulmonares, proliferação do músculo liso vascular nos vasos pulmonares e espessamento da parede da artéria pulmonar (Morita et al., 1996; Brown et al., 1998; Ito et al., 2000; Shermuly et al., 2004; Barreto et al., 2005; Lourenço et al., 2006; Mc Laughlin et al., 2006; Lamberts et al., 2007).

Além disso, MCT também promove as seguintes alterações: a) aumento da resistência vascular pulmonar, progredindo para um aumento da pressão arterial pulmonar; b) hipertrofia do ventrículo direito, pelo aumento da sobrecarga de trabalho imposta ao coração, acarretando em aumento da espessura da parede ventricular direita; c) aumento da atividade da enzima LDH total (lactato desidrogenase), com conseqüente aumento de seu subtipo anaeróbio e diminuição de seu subtipo cardíaco (Ishikawa et al., 1997), o que justifica a hipóxia ser uma das causas da hipertensão pulmonar. Esta enzima é responsável pelo aumento da produção de lactato no plasma, o que prejudica o trabalho do músculo esquelético e diminui a tolerância ao exercício.

Outros autores observaram diminuição da resposta máxima de contração da artéria pulmonar para a noradrenalina plasmática circulante, como resultado da exposição prolongada dos receptores cardíacos à altas concentrações desse neurotransmissor, o que indica um aumento na atividade do sistema nervoso simpático no início da doença, como forma de suprir as necessidades metabólicas do organismo (Shubat et al., 1989; Dhein et al., 2002; Oriowo et al., 2003), e redução da atividade vagal prejudicando o relaxamento vascular promovido indiretamente pela acetilcolina (Gout et al., 1999 e Ito et al., 2000), contribuindo, assim, para a vasoconstrição (Sanyal e Ono, 2001).

Por outro lado, a aorta não apresenta tais alterações de modo significativo, uma vez que a perda da função endotelial é mais pronunciada na artéria pulmonar do que na aorta, pelo fato da primeira ser mais vulnerável às alterações funcionais e morfológicas decorrentes da HAP (Gout et al., 1999).

A vasoconstrição decorrente da HAP é mediada por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, sendo responsáveis pela resposta vasoconstritora e hipertrófica associada ao aumento do peso do ventrículo direito (Chen et al., 1999). Esses receptores são divididos em subtipos  $\alpha$ -1<sub>a</sub>,  $\alpha$ -1<sub>b</sub> e  $\alpha$ -1<sub>d</sub>, sendo a artéria pulmonar de ratos constituída predominantemente pelo tipo  $\alpha$ -1<sub>d</sub> (Dhein et al., 2002; Oriowo et al., 2003). A resposta hipertrófica, por sua vez, é uma combinação de sinais dos receptores  $\alpha$ -1<sub>a</sub> e  $\alpha$ -1<sub>b</sub> (Steinberg, Susan F., 2002), sendo que Brodde e Michel (1999), destacaram que, no rato, essa hipertrofia ocorre predominantemente, se não exclusivamente, pelo estímulo de receptores  $\alpha$ -1<sub>a</sub>, que é o subtipo mais predominante no coração humano, enquanto que o subtipo  $\alpha$ -1<sub>b</sub>, responsável pelo efeito inotrópico positivo, é o mais abundante no coração desses roedores.

Com relação aos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, estudos comprovaram que os mesmos estão envolvidos na regulação da resposta cronotrópica e inotrópica em ratos, humanos, porcos e cães (Pelá et al., 1990), além de modularem o tônus vascular através da vasodilatação do músculo liso vascular quando a concentração das catecolaminas estiver muita elevada (Arribal et al., 1994). Brodde e Michel (1999) destacaram que os receptores  $\alpha$ -1 tem a capacidade de bloquear a ação dos sub-tipos  $\beta$ , se a HAP progredir para falência cardíaca. Nesse estágio patológico verifica-se uma diminuição na densidade do receptores  $\beta$ -1 no músculo cardíaco, enquanto os sub-tipos  $\beta$ -2 não têm sua densidade significativamente modificada em ratos com falência cardíaca decorrente de HAP (Brown et al., 1998; Pelá et al., 1990; Leinweber et al., 2002). De fato, estudos demonstraram significativa redução da atividade noradrenérgica no ventrículo direito devido ao menor acoplamento neurotransmissor-receptor (Leinweber et al., 2002), assim como diminuição da resposta de receptores  $\beta$ -1 em cardiomiócitos e  $\beta$ -2 em células endoteliais (Seyfarth et al., 2000), em ratos portadores de HAP.

Por outro lado, a hipertrofia ventricular direita conseqüente à HAP pode aumentar a força de contração cardíaca por proporcionar aumento do débito cardíaco com a melhora da performance do ventrículo direito hipertrofiado, no início do desenvolvimento dessa doença (Brown et al.,1998). Com a evolução da HAP, observa-se redução dessa resposta compensatória em conseqüência da progressiva insuficiência cardíaca devido à sobrecarga de trabalho imposta ao coração. Esse efeito inotrópico positivo também é observado no ventrículo esquerdo, neste mesmo estágio da doença, provavelmente compensando o lado direito do coração (Brown et al.,1998). De fato, Lamberts et al. (2007), também verificaram que a função do ventrículo esquerdo pode ser alterada em casos de hipertrofia do ventrículo direito por HAP, pois, além da interação das forças de contração entre os ventrículos através do septo interventricular, há uma compensação neuro-humoral para a função cardíaca diminuída afetando, assim, os dois ventrículos. Segundo esses autores, essa compensação se dá pelo aumento das concentrações plasmáticas de endotelina 1, angiotensina II e noradrenalina, que contribuem para o efeito inotrópico positivo que ocorre inicialmente na hipertrofia cardíaca patológica, como maneira de responder a demanda metabólica de oxigênio do organismo prejudicada pelo remodelamento cardíaco e pulmonar.

Seyfarth et al. (2000), como visto anteriormente, relataram que, embora haja uma diminuição na densidade dos receptores  $\beta$  (1 e 2) no coração de ratos com HAP induzida por MCT, essa mudança é mais pronunciada no ventrículo direito, ocorrendo desacoplamento da atividade desses receptores com seu sistema efetor de segundo mensageiro intracelular (proteína G – AMPc). Tal fato não ocorre no ventrículo esquerdo com os receptores  $\beta$ -adrenérgicos que permanecem intactos, devido, provavelmente, a uma super-estimulação neuro-endócrina dessa câmara cardíaca.

Esses resultados sugerem que a alteração na função ventricular direita na HAP crônica pode ocasionar mudanças na sinalização dos receptores cardíacos noradrenérgicos, acarretando em mudanças funcionais e morfológicas tanto nos vasos quanto nas câmaras cardíacas.

Assim, de todas as características cardiovasculares da HAP, a que mais identifica esta doença é a hipertrofia do ventrículo direito, como descrita anteriormente. Vários estudos em ratos demonstraram o aumento da razão entre o peso do ventrículo direito e o peso do ventrículo esquerdo/septo, principalmente a partir da 4ª semana após o tratamento com MCT (Brown et al., 1998; Werchan et al., 1989; Pelá et al., 1990), assim como o aumento da razão entre o peso do ventrículo direito e o peso corpóreo e da razão entre o peso do ventrículo direito e o peso do ventrículo esquerdo sem o septo (Bruner et al., 1983; Ishikawa et al., 1994; Gout et al., 1999; Leineweber et al., 2000; Seypharth et al., 2000; Chen et al., 2001). Também foram observadas perdas transitórias de peso do ventrículo esquerdo (Favret et al., 2001).

Como visto, o controle do tônus vascular é um importante fator na prevenção ou tratamento de doenças cardíacas, sendo que o endotélio participa de forma direta nessa regulação, exercendo funções autócrinas, parácrinas e endócrinas (Vogel, 1999). Estruturalmente, é uma monocamada de células alongadas, estrategicamente localizadas entre a parede dos vasos sanguíneos e a corrente sanguínea (Laroia et al., 2003), que responde a estímulos mecânicos, como pressão e *shear stress*, e químicos exercidos por substâncias vasoativas como a acetilcolina e noradrenalina, por exemplo. O conjunto de respostas vasodilatadoras e vasoconstritoras a estímulos físicos e farmacológicos é denominado de reatividade vascular (Luz et al., 2003).

O objetivo final da terapêutica visando recuperar a função endotelial baseia-se nas intervenções que aumentem a biodisponibilidade de NO, tanto pelo aumento de sua produção, quanto pela redução de sua degradação reduzindo, por exemplo, a produção de radicais oxidativos. Dada a importância do endotélio, fica clara a necessidade de se compreender suas funções e o seu papel na gênese e progressão das doenças cardiovasculares, bem como reconhecer sua estreita relação com o prognóstico dos pacientes frente a essas enfermidades.

Assim, substâncias vasodilatadoras com ação independente do endotélio, como, por exemplo, o Sal de Angelis (HNO), constitui uma interessante ferramenta

experimental para o estudo da integridade da musculatura lisa vascular, bem como dos mecanismos envolvidos no seu relaxamento (Irvine et al., 2003).

Por outro lado, a atividade elétrica cardíaca pode ser avaliada através do eletrocardiograma (ECG), uma vez que é a melhor forma não invasiva de medir a geração de potenciais elétricos de despolarizações sequenciais do tecido cardíaco, assim como a condução desses potenciais e o grau de hipertrofia das câmaras cardíacas. Pelo fato da HAP promover hipertrofia ventricular direita, Uma alteração eletrocardiográfica característica dessa alteração é o desvio do eixo elétrico do complexo QRS para a direita (Bruner et al., 1983 e McLaughlin et al., 2006). Além disso, McLaughlin et al. (2006), destacaram a presença de inversão da onda T no ECG de ratos com HAP, indicando problemas na repolarização ventricular decorrentes, provavelmente, de processos cardíacos isquêmicos.

Frente ao exposto, este trabalho teve por objetivo implantar o modelo experimental de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina em ratos Wistar machos adultos no laboratório cardiovascular de esforço, através da determinação da atividade elétrica cardíaca pelo registro do eletrocardiograma, da pressão arterial sistêmica, da reatividade vascular e da histologia cardíaca, pulmonar e hepática.

## **II. OBJETIVOS**

Este trabalho teve por objetivo implantar o modelo experimental de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina em ratos Wistar machos adultos no laboratório cardiovascular de esforço, através da determinação da atividade elétrica cardíaca pelo registro do eletrocardiograma, da pressão arterial sistêmica, da reatividade vascular e da histologia cardíaca, pulmonar e hepática.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **III.1. Animais.**

Foram utilizados ratos machos Wistar adultos, pesando 250g, fornecidos pelo CEMIB (Centro multidisciplinar de investigação biológica) da Unicamp, alojados em gaiolas coletivas, seis animais em cada, no Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica com ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura de 20 graus centígrados, alimentados com ração *ad libitum* e água à vontade.

Experimento aprovado pela Comitê de ética na experimentação animal (CEEAA)/Unicamp. Protocolo número: 1650-2.

#### **III.2. Grupos experimentais.**

- Ensaio biológico *in vitro*: os animais foram distribuídos em seis grupos:

1- ratos controle + noradrenalina (CO NA);

2- ratos controle + acetilcolina (CO ACh);

3- ratos controle + sal de Angelis (CO HNO);

4- ratos portadores de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina ( 28 dias após a administração da MCT) + noradrenalina (MT NA);

5- ratos portadores de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina ( 28 dias após a administração da MCT) + acetilcolina MT ACh);

6- ratos portadores de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina ( 28 dias após a administração da MCT) + sal de Angelis (MT HNO);

- Ensaio biológico sub-crônico: os animais foram distribuídos em 2 grupos para a análise eletrocardiográfica e morfológica:

1-ratos controle (CO);

2-ratos portadores de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina (MT - 28 dias após a administração da MCT));

### **III.3. Indução da Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)**

Os animais receberam dose única intraperitoneal de MCT (ACRÔS Organics, New Jersey, USA.), 60mg/kg de peso corpóreo. A MCT foi dissolvida em HCl 1N e o pH foi neutralizado com NaOH 1 N. O volume da solução foi ajustada com tampão fosfato (pH 7.4) para alcançar uma concentração de 30 mg/ml (Sun e Ku, 2005).

### **III.4. Peso dos animais e órgãos.**

Os animais foram pesados no início e no final do período experimental de 28 dias. Após o sacrifício sob aprofundamento da anestesia, os órgãos foram retirados para a determinação do peso fresco absoluto e o peso relativo (g/100g peso corpóreo).

#### **Determinação do peso do coração e ventrículos.**

O coração foi removido, as câmaras foram abertas para a remoção do excesso de sangue, após o qual o coração foi pesado. O átrio e os grandes vasos foram removidos e o coração foi separado em ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE), incluindo o septo, os quais foram pesados separadamente (Leineweber et al., 2000).

### **III.5. Parâmetros morfológicos**

O coração, fígado e pulmões foram isolados após os animais serem eutanasiados através de aprofundamento de anestesia (Ketamina+xilazina, 10mg/Kg), e logo em seguida foram pesados e colocados em solução de Bouin por 72 horas. Em seguida cada órgão foi lavado sucessivamente em solução contendo tampão fosfato e salina e desidratados com álcool 70% durante 16 horas. Após esta passagem, seguiu-se desidratação com álcool 80% (1 hora), álcool 95% (1 hora), 4 passagens por álcool 100% (30 minutos cada passagem) e álcool 100%+xilol (1:1) por 30 minutos em estufa. Após este procedimento, os

tecidos foram transferidos para forma contendo parafina, permanecendo em estufa por 3 horas. Em seqüência, cada bloco foi retirado das formas e o excesso de parafina removido. Os cortes histológicos foram realizados com micrótomo e fixados em lâminas com albumina. Em seguida, os cortes foram corados pelos métodos de hematoxilina eosina (HE) e pelo Ácido de Schiff. Foram obtidas imagens das lâminas no microscópio Leica (40X e 100x) sendo realizada a análise histológica utilizando-se o *software* Image Pro Plus (Schermuly et al., 2003).

### **III.6. Parâmetros eletrocardiográficos.**

O eletrocardiograma (ECG) foi realizado em eletrocardiógrafo computadorizado, modelo Heart Ware, com os animais sob anestesia (Ketamina + Xelazina, 10mg/kg de peso corporal). Os eletrodos, em forma de agulha, foram fixados subcutâneamente nas quatro posições convencionais, nos membros estendidos com os animais na posição supina. Os registros foram realizados nas derivações bipolares (DI, DII e DIII) e amplificadas (aVR, aVL e aVF), com velocidade 50mm/segundo e sensibilidade 2N. Foram determinadas a frequência cardíaca, a amplitude e duração das ondas e duração dos intervalos e segmentos eletrocardiográficos. O intervalo QT foi corrigido (QTc) pela fórmula de Bazzet's (Sagie et al., 1992).

### **III.7. Determinação da pressão arterial – método direto.**

Os animais foram anestesiados como descrito anteriormente. A seguir, uma cânula (PE 10) foi introduzida na artéria femoral direita e conectada a um transdutor de pressão arterial para obter registro da pressão arterial sistólica, diastólica e média através do equipamento BP-1-Analog single-channel transducer signal conditioner-World Precision Instruments (Toma et al., 2008)

### **III.8. Preparação de anéis das artérias aorta e pulmonar isoladas.**

Para o estudo da reatividade vascular os anéis de artérias aorta e pulmonar foram isoladas e preparadas de acordo com Furchgott e Zawadzki (1980) e adaptado por Zanichelli e colaboradores (2004, 2007). Os ratos foram eutanaziados por aprofundamento da anestesia. O tórax foi aberto por meio de uma incisão mediana, a porção torácica da artéria aorta e a artéria pulmonar principal foram removidas e divididas em anéis de aproximadamente 4mm de comprimento cada. Cada anel foi montado em 2 ganchos de aço inox em forma de L, com a parte menor atravessando a parte interna do anel. Esses ganchos foram colocados individualmente em uma cuba contendo solução fisiológica de Krebs-Henseleit da seguinte composição (em mMol.L<sup>-1</sup>): NaCl, 115,0; KCl, 4,6; NaHCO<sub>3</sub>, 25,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2,5; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; glicose, 11, e ácido ascórbico, 0,11 e constantemente borbulhada com O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%). A temperatura do banho foi mantida em 36,5 a 37 ° C, com o auxílio de uma bomba de perfusão (Ética Equipamentos Científicos S.<sup>a</sup>, São Paulo, SP, Brasil). Após a instalação do anel da artéria na cuba, foi induzida mecanicamente uma pressão de 2g na artéria aorta (Furchgott e Zawadzki,1980 e adaptado por Zanichelli e colaboradores, 2004, 2007) e 0,5g na artéria pulmonar (adaptação do protocolo de Gout et al, 1999), a qual foi mantida durante todo o experimento.

Para o registro das tensões desenvolvidas, foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Narco Bio-System (modelo F-60), conectado a um polígrafo de 4 canais Narco Bio-System (modelo DMP-4, Houston, Tx, EUA). Os anéis permaneceram por um período de 30 minutos de estabilização (Irvine et al 2003 e Irvine et al, 2007). Em seguida, foram traçadas curvas concentração-efeito para noradrenalina, acetilcolina e Sal de Angelis.

### **III.9 Obtenção de curvas concentração-efeito**

Curvas concentração-efeito (CCE) foram obtidas pelo método cumulativo, com incrementos sucessivos de 0,5 unidades logarítmica na concentração molar

de agonista (VAN ROSSUM, 1983). A resposta máxima foi determinada quando três concentrações sucessivas crescentes do agonista não promoverem respostas maiores que a obtida com a concentração imediatamente anterior.

A sensibilidade dos anéis das artérias aorta e pulmonar foi avaliada pela determinação do valor  $pD_2$  de cada agonista. Este corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima ( $EC_{50}$ ) em cada experimento.

Em cada anel foi obtida uma CCE para a noradrenalina ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$ M). Ao final desta, novos anéis foram utilizados para a CCE da acetilcolina ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$ M) e Sal de Angelis ( $10^{-10}$  -  $10^{-5}$ M ; Irvine et al, 2003), após serem pré-contraídos com Noradrenalina de concentração ( $10^{-6}$ M) e passarem por uma estabilização de 35 minutos.

### III.10 Drogas e reagentes

Anestésico: Ketamina + Xilazina, proveniente da Agener União Química Farmacêutica nacional S/A (São Paulo, BR).

Agonistas: (+-) arterenol (bitartarato de noradrenalina) e Acetilcolina (iodeto de acetilcolina), provenientes da Sigma- Aldrich Química do Brasil Ltda; e Sal de Angelis (HNO), proveniente da Cayman chemicals (Ann Arbor, MI).

Monocrotalina (MCT): - ACRÓS Organics (New Jersey, USA). A MCT foi preparada dissolvida em 1 N HCl. O pH será neutralizado com 0.5 N de NaOH e o volume de solução foi ajustado com tampão fosfato (pH 7.4) para alcançar uma concentração de 30 mg/mL.

Todos os sais utilizados para o preparo da solução de Krebs Hanseleit foram padrões ACS. As soluções estoques de noradrenalina e acetilcolina foram preparadas em solução de ácido ascórbico 2% e armazenadas a 20°C, por no máximo sete dias.

A solução de HNO foi preparada diluindo o sal em  $10^{-3}$ M de NaOH (Wanstall et al, 2001). As diluições das drogas agonistas foram feitas em solução de Krebs-Henseliet imediatamente antes do uso, e descartadas em seguida.

### III.11. Análise estatística dos resultados

Foi utilizado o software Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA), para os cálculos estatísticos. Os valores de  $pD_2$  dos fármacos utilizados no ensaio *in vitro* foram determinados através da análise da regressão linear. As curvas concentração–efeito foram obtidas com valores para resposta na ausência de substâncias agonistas iguais a zero. Os resultados de peso corpóreo, peso relativo dos órgãos, pressão arterial sistêmica e parâmetros eletrocardiográficos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Já os resultados da reatividade vascular foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A comparação entre os valores dos parâmetros analisados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação entre três ou mais grupos. O teste t de Student foi utilizado para comparar dois grupos distintos. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1. Peso corpóreo e de órgãos.

Na **tabela 1** encontram-se os dados referentes ao peso corpóreo dos ratos controles e portadores de HAP induzida por monocrotalina. Na **figura 1** encontra-se a variação de peso corpóreo dos grupos experimentais.

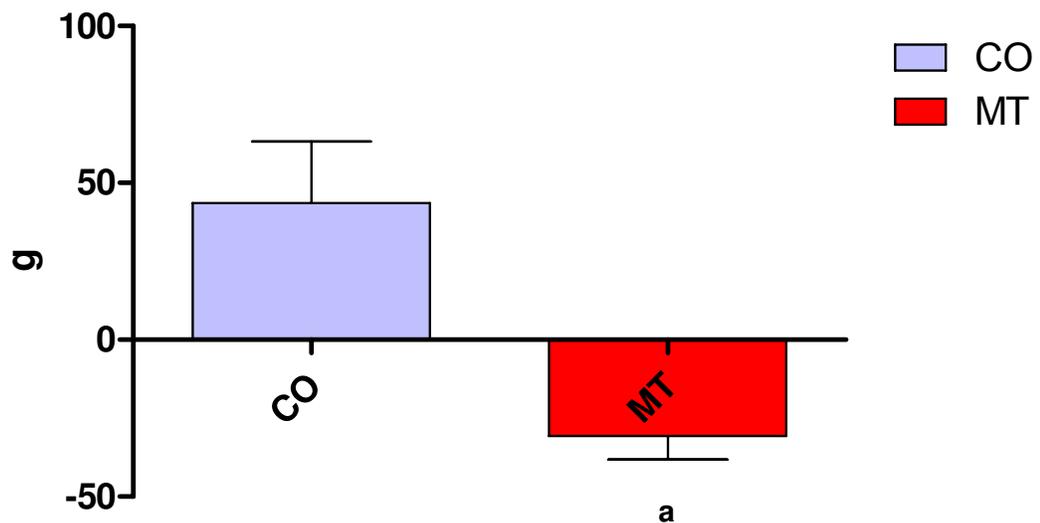
Podemos observar que 28 dias após a administração da MCT, enquanto os animais do grupo controle (CO) ganharam peso, os do grupo portador de HAP (MT) apresentaram redução significativa de peso corpóreo. Nossos resultados estão de acordo com Gout et al. (1999), Leweber et al. (2000), Chen et al. (2001), Schermuly et al. (2003) e Maruyama et al. (2007), os quais também observaram perda de peso nos ratos portadores de HAP, 28 dias após a administração da MCT. Leineweber et al. (2000), observaram nos animais que receberam a injeção de MCT, dispnéia e diminuição no consumo de ração entre a quarta e sexta semana após a administração da droga. Atribuímos, portanto, a perda de peso corpóreo às conseqüências das alterações na atividade metabólica geral do organismo provocadas pela hipertensão arterial pulmonar.

A diminuição do apetite e a perda de peso são uns dos primeiros sinais de diversas doenças pulmonares. A alteração do pH do sangue decorrente de variações nas pressões parciais de oxigênio e gás carbônico também pode contribuir para a falta de apetite e baixo ganho de peso. As respirações rápidas e o esforço respiratório devido a progressão da doença, também colaboram para aumentar o gasto de energia e, conseqüentemente, reduzir o peso corpóreo. De fato, o sintoma mais comum da HAP é a intolerância ao esforço (dispnéia de esforço) e a fadiga, decorrentes do baixo débito cardíaco, de caráter progressivo e indicativo de disfunção ventricular direita secundária. Além disso, outros sintomas podem aumentar a morbidade decorrente da HAP. Dessa forma, dor precordial ao esforço pode indicar uma cardiopatia isquêmica ventricular direita por redução do fluxo e da pressão de perfusão coronariana. Sensação de síncope ou pré-síncope são sintomas preocupantes, pois refletem o baixo débito cardíaco por disfunção ventricular direita e/ou arritmia ventricular. A cianose é um sinal importante,

podendo ser secundária ao baixo débito, à vasoconstrição periférica ou à inadequação da relação ventilação/perfusão pulmonar (Guimarães, 2005) - Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Pulmonar – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia; Galiè and Rubin, 2004).

Grupos	Peso Corpóreo Inicial (g)	Peso Corpóreo Final (g)
CO	341,50± 13,67	395,30± 30,00
MT	331,30± 22,74	<sup>a</sup> 300,53± 21,86

**Tabela 1.** Peso corpóreo (inicial e final) dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste t de Student; (p<0,05): (a) CO x MT (peso corpóreo final); (n = 10).



**Figura 1.** Variação de peso corpóreo, ao final do período experimental, dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste t de Student; (p<0,05): (a) CO x MT (peso corpóreo final); (n = 10)..

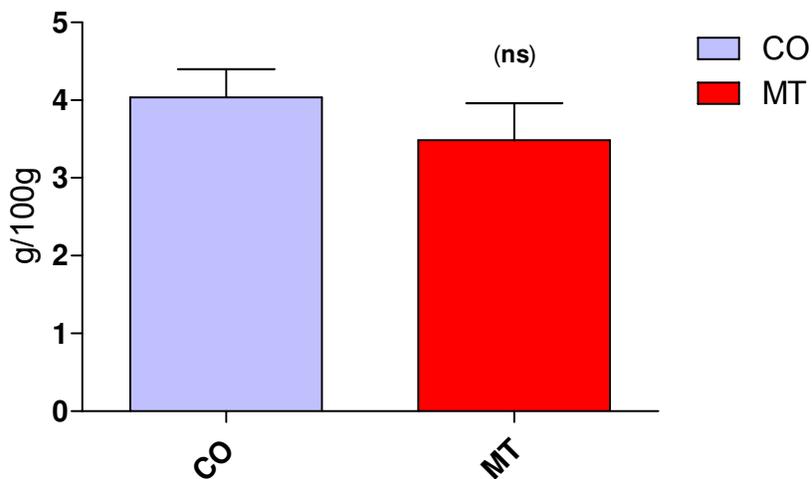
As **figuras 2, 3 e 4** apresentam, respectivamente, os valores dos pesos relativos do fígado, pulmões e coração, incluindo os ventrículos, dos grupos CO e MT.

Em relação ao fígado (**figura 2**), este órgão não apresentou diferenças significativas no peso relativo quando comparamos os grupos CO e MT, embora tenham sido observadas alterações estruturais típicas desta doença no tecido hepático (o que será visto adiante). Este dado confere com os resultados obtidos por Brown et al. (1998) que também estudaram animais portadores de HAP, embora a dose de MCT para indução da doença tenha sido maior (105mg/Kg de peso corpóreo). Já Leineweber et al. (2002) administraram dose menor de MCT (50mg/Kg) para indução da doença e encontraram aumento no peso relativo do fígado de animais portadores de Hipertensão Arterial Pulmonar.

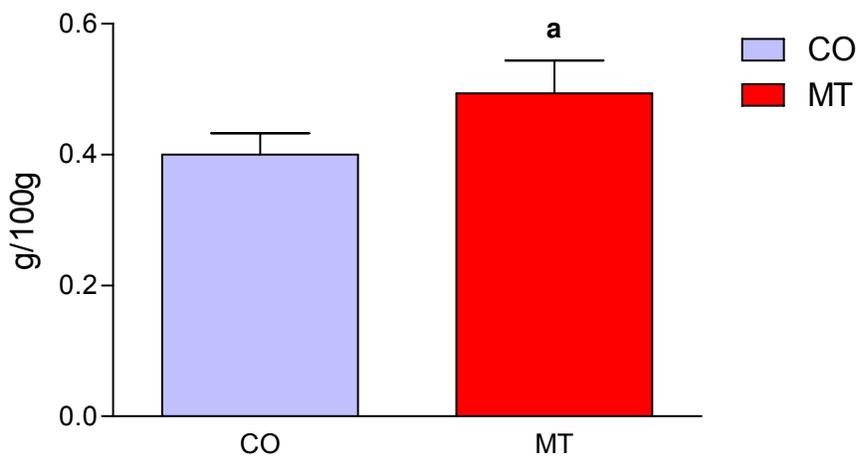
Nos pulmões (**figura 3**), observou-se significativo aumento do peso relativo dos animais tratados com monocrotalina devido, provavelmente, ao menor volume alveolar e aumento da área ocupada por tecidos extra-alveolares, como veremos posteriormente na análise morfológica deste órgão. Como se sabe, o peso específico pulmonar varia dependendo do fato do pulmão estar cheio de ar ou não. No primeiro caso, é mais leve do que a água podendo flutuar; no segundo, ao contrário, é mais pesado podendo afundar se colocarmos um fragmento pulmonar em um recipiente com água. Nossos resultados estão de acordo com os estudos de Brown et al. (1998), Gout et al. (1999), Ito et al. (2000) e Leineweber et al. (2002), que encontraram aumento significativo na razão do peso dos pulmões/peso corpóreo neste mesmo modelo animal.

Quanto ao coração (**figura 4**), observamos significativo aumento do peso cardíaco devido ao aumento do peso do ventrículo direito hipertrofiado dos animais portadores de HAP. Sugerimos que a significativa hipertrofia ventricular foi provocada pela sobrecarga imposta ao ventrículo direito pelo aumento da resistência vascular pulmonar dos animais tratados com monocrotalina, como demonstraremos a seguir na análise morfológica. Esses dados são corroborados por Brown et al. (1998), Gout et al. (1999), Ito et al. (2000) e Leineweber et al. (2002).

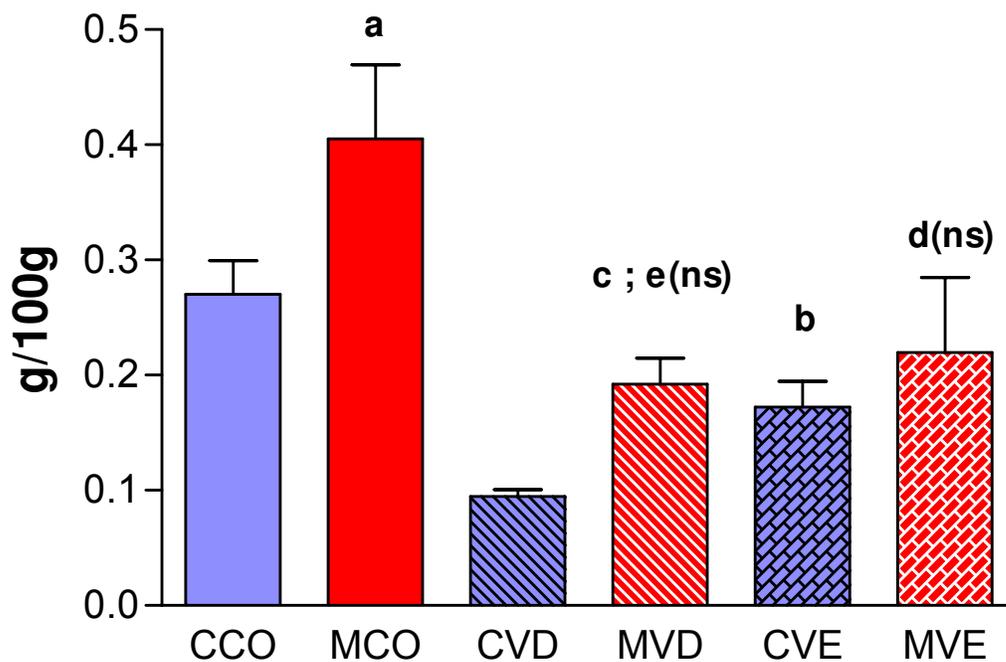
O ventrículo esquerdo não apresentou alteração significativa no seu peso relativo quando comparamos os animais do grupo MT com os do grupo CO, como mostra também os estudos de Dhein et al. (2002), Leineweber et al. (2000) e Leineweber et al. (2002), corroborando com os nossos resultados de que o aumento do peso cardíaco nos animais que receberam a injeção de monocrotalina (grupo MT), se deve à hipertrofia do ventrículo direito.



**Figura 2.** Peso relativo do fígado (g/100g peso corpóreo) dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO x MT, (ns) não significativo; (n = 10).



**Figura 3.** Peso relativo dos pulmões (g/100g peso corpóreo) dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO x MT; (n = 10)..



**Figura 4.** Peso relativo do coração e câmaras cardíacas (g/100g peso corpóreo) dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Sendo: controle coração (CCO); monocrotalina coração (MCO); controle ventrículo direito (CVD); monocrotalina ventrículo direito (MVD), controle ventrículo esquerdo (CVE), monocrotalina ventrículo esquerdo (MVE). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey ; ( $p < 0,05$ ): (a) CCO X MCO, (b) CVE X CVD, (c) CVD X MVD, (d) CVE X MVE, (e) CVE X MVD, (ns) não significativo; (n = 10).

## IV.2. Parâmetros Morfológicos

### IV.2.1. Morfologia Hepática

Na necropsia o fígado apresentou superfície irregular, áreas brancas misturadas com áreas vermelho-escuras, resultado semelhante ao observado por Karam et al. (2004). A **figura 5** apresenta fotomicrografias do fígado de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). Notam-se, em toda a área do tecido hepático examinado, hepatócitos aumentados com núcleos de formas e tamanhos irregulares e granulações citoplasmáticas e nucleares atípicas sugestivas de apoptose nos animais portadores de HAP. Nossos resultados são corroborados por diversos autores (Yan and Hustable, 1995; Mingatto et al., 2007; Mingatto et al., 2008;), os quais observaram que a monocrotalina causa citotoxicidade e genotoxicidade em animais e humanos.

A monocrotalina é um alcalóide pirrolizidínico que contém nitrogênio, usualmente nos anéis heterocíclicos, os quais são responsáveis pela sua toxicidade (Cheeke, 1998). Para serem hepatotóxicos necessitam de ligação dupla 1,2 no núcleo pirrolizidínico e uma ramificação no grupamento éster, causando danos irreversíveis ao fígado (Cheeke, 1994). Os alcalóides pirrolizidínicos contidos nas plantas não são quimicamente reativos, grande parte deles é excretada na forma inalterada. No entanto, podem ser biotransformados pelo fígado em produtos tóxicos. Suas principais rotas de metabolismo hepático são a hidrólise pelo éster, a N-oxidação e a desidrogenação. As duas primeiras reações representam mecanismos de desintoxicação, enquanto que a desidrogenação forma os pirróis e está associada com a toxicidade dos alcalóides. O equilíbrio entre essas reações é que determina o efeito tóxico dos alcalóides pirrolizidínicos (Mattocks, 1986).

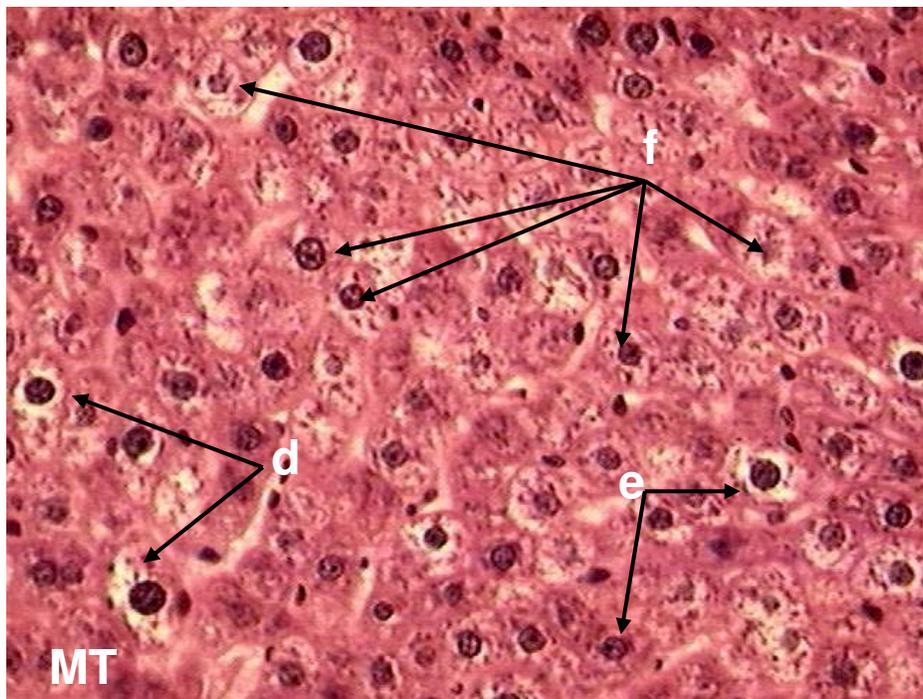
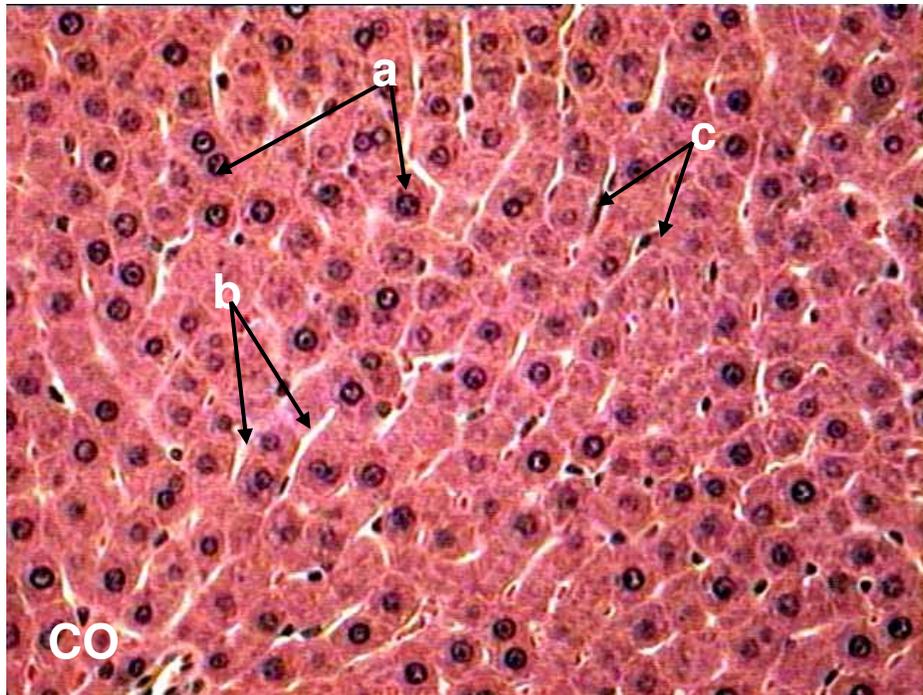
Os pirróis são eletrofilicos e reagem com componentes teciduais nucleofilicos, como ácidos nucléicos e proteínas (Sperl et al., 1995). Como o fígado é local de produção desses pirróis tóxicos, ele é um dos principais órgãos alvo, seguido pelos pulmões (Cheeke, 1998). Os pirróis lesam as células

hepáticas por inibição da mitose, causando megalocitose, necrose e redução do número de hepatócitos, que são substituídos por tecido fibroso acarretando em disfunção hepática (Seawright et al., 1991), como observado no grupo MT (figura 5).

Uma parte dos pirróis produzidos no fígado pode migrar para a circulação geral, causando lesões em outros tecidos, sendo a causa da nefrose e da pneumonia intersticial (Radostits et al., 2002). Outros órgãos, como o pulmão, também produzem pirróis por conterem enzimas do sistema citocromo P450 (Kim et al., 1993).

Alterações degenerativas, como vacuolização de hepatócitos com núcleos picnóticos ou ausentes e granulações citoplasmáticas são características de doença hepática (Colodel et al., 2000; Santos et al., 2008), como descrito anteriormente. Esse aspecto generalizado, em toda a área da lâmina histológica, permite supor a instalação de um quadro de insuficiência hepática nos animais tratados com monocrotalina. Nossa proposição está de acordo com Santos et al. (2008), os quais afirmaram que a insuficiência hepática ocorre somente em lesões difusas quando há comprometimento de 75% do parênquima hepático, fato que foi observado na análise histológica dos animais portadores de HAP.

Pretendemos, futuramente, determinar enzimas hepáticas, como a transaminase-glutâmico-pirúvica, fosfatase alcalina e transaminase-glutâmico-oxalacética que se encontram em grandes concentrações nos hepatócitos, para avaliar bioquimicamente a presença de doença hepática, assim como marcadores de apoptose celular neste modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.



**Figura 5.** Fotomicrografia do fígado de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Observam-se hepatócitos com um ou dois núcleos com tamanhos equivalentes (a) e sinusóides (b) onde se encontram células de Kupfer (c) de formato alongado caracterizando um tecido normal (CO). Notam-se hepatócitos aumentados com alterações citoplasmáticas (d), núcleos de formas e tamanhos irregulares (e), hepatócitos com granulações citoplasmáticas e nucleares atípicas sugestivas de processo apoptótico (f). H.E. 40 X.

#### IV.2.2. Morfologia Pulmonar

Após a entrada no parênquima pulmonar, os brônquios ramificam-se de forma dicotômica até estruturas microscópicas, os bronquíolos. Enquanto os brônquios são caracterizados por apresentarem placas cartilagosas e glândulas mucosas na parede, à medida que se distanciam da origem escasseiam a cartilagem e as glândulas, havendo apenas células musculares lisas e matriz extracelular rica em fibras elásticas. São denominados *bronquíolos terminais* aqueles cuja parede é delgada e que apresentam epitélio respiratório contínuo em toda a circunferência. Eles suprem a porção da via aérea que se convencionou chamar de ácino pulmonar. Logo na entrada do ácino encontramos os chamados *bronquíolos respiratórios*, cujas paredes são interrompidas pela abertura de um ou mais alvéolos. Estes por sua vez ramificam-se em estruturas retas, os *ductos alveolares*, constituídas por alvéolos alinhados. A porção mais distal desses ductos abre-se como um saco alveolar. Ao lado de cada bronquíolo e ducto alveolar observa-se a presença de um ramo da artéria pulmonar. Alguns alvéolos apresentam também pequenas arteríolas em sua parede. Aquelas que acompanham bronquíolos maiores até o nível do bronquíolo terminal são denominadas artérias ou arteríolas “pré-acinares”, enquanto que as que se situam junto aos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e nas paredes dos alvéolos, são designadas por arteríolas “intra-acinares” (Lopes, 2005)

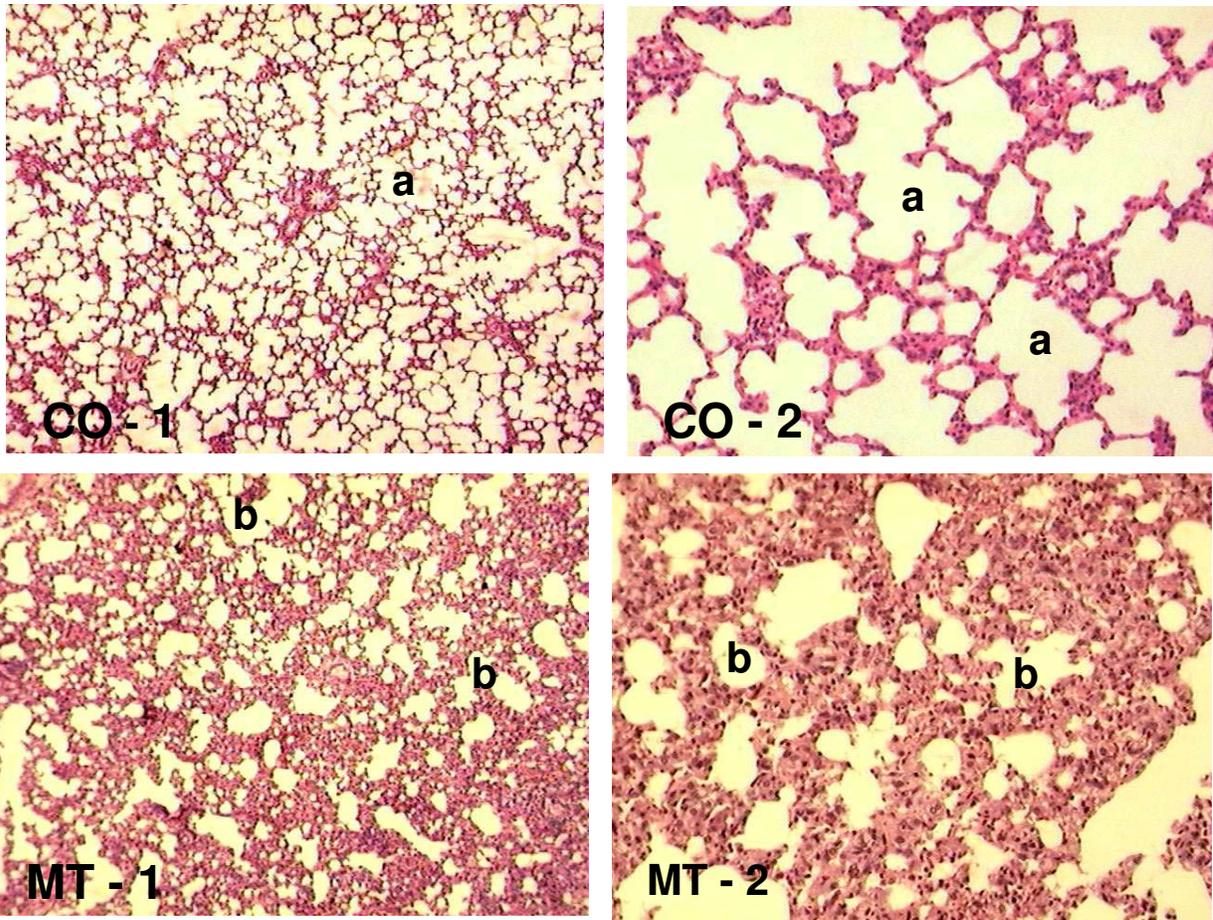
A **figura 6** apresenta fotomicrografia do tecido pulmonar de ratos dos grupos experimentais. Observam-se alvéolos íntegros ocupando a maior parte do parênquima pulmonar caracterizando um tecido normal no grupo controle e predominância de tecido extra-alveolar com redução aparente da área alveolar nos animais portadores de HAP, sugestivo de colapso alveolar. Esses dados são corroborados por Schermuly et al. (2003).

De fato, ao lado da hipóxia, a hipertensão arterial pulmonar surge igualmente associada à elevada mortalidade nas diversas situações que conduzem à insuficiência respiratória aguda. Neste contexto a hipertensão arterial pulmonar aumentando a filtração capilar, acentua o edema alveolar e promove

disfunção ventricular direita. Na sua fase inicial, a hipertensão arterial pulmonar decorre da vasoconstrição hipóxica, à ação de mediadores circulantes, como a tromboxana A<sub>2</sub>, a endotelina e o fator de ativação plaquetária (Barreto et al., 2005; Goret et al., 2005; McLaughlin e McGoon., 2006; Said et al., 2006).

Tardiamente, a hipertensão pulmonar se mantém em razão de microtrombose difusa, hipertrofia da camada média das arteríolas, fibrose, aumento da permeabilidade vascular pulmonar (o que facilita a infiltração leucocitária) e destruição da rede vascular pulmonar (Miyachi et al., 1993). Dessa forma, o colapso gravitacional é uma constante, sendo que o pulmão comporta-se como um verdadeiro "corpo líquido", ou seja, desaba sobre si mesmo sob o efeito da gravidade. Isto significa que as porções dependentes do pulmão estão sujeitas a uma pressão externa (atuando no sentido do colapso alveolar) proporcional a sua posição dentro do tórax.

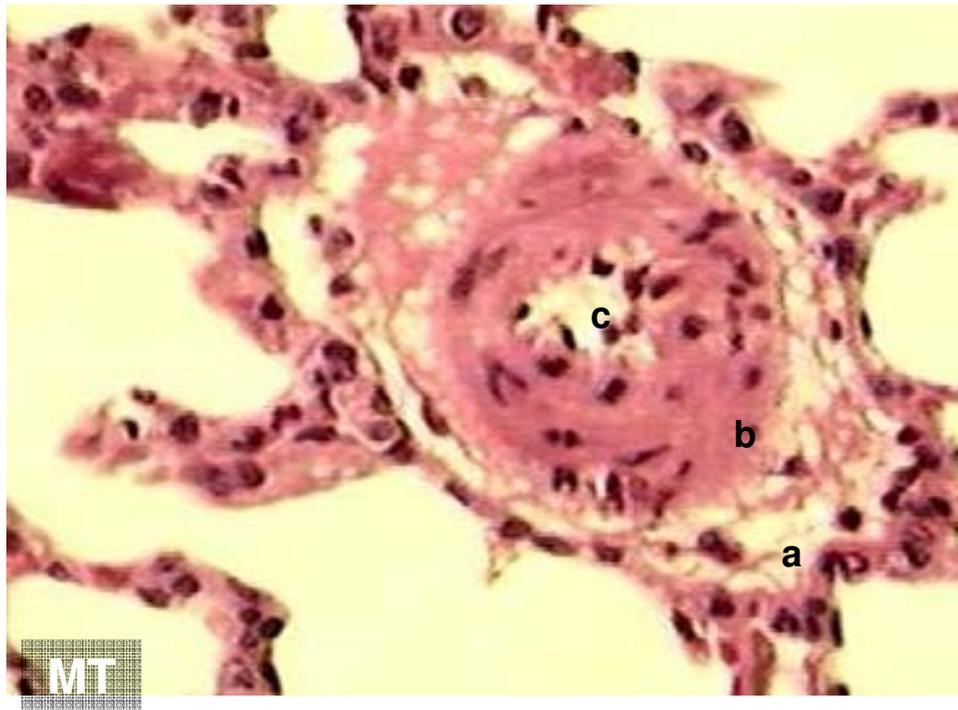
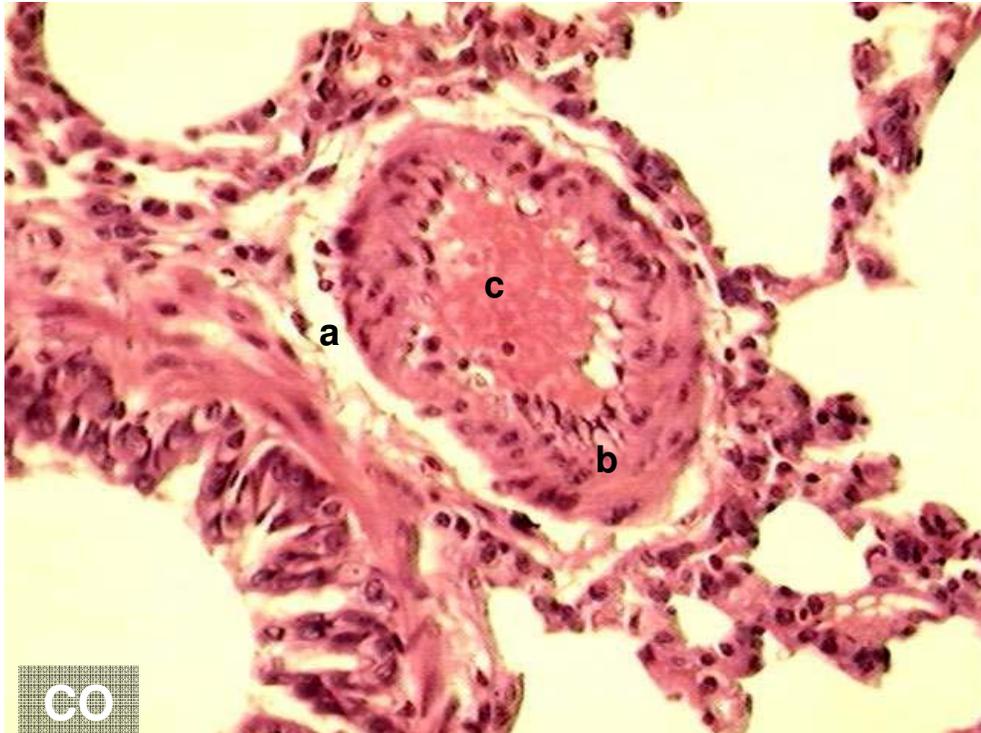
Essas características fazem com que o volume de ar corrente se distribua preferencialmente por áreas previamente abertas, causando hipertensão das áreas superiores. No pulmão normal de um indivíduo adulto, a relação gás-tecido é de aproximadamente 30% de tecido e 70% de gás. Na hipertensão arterial pulmonar essa relação gás-tecido diminui, aumentando a quantidade de tecido e diminuindo a complacência pulmonar, por edema alveolar, o que diminui o tamanho do alvéolo (Hoelz et al, 2001).



**Figura 6.** Fotomicrografia do tecido pulmonar de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Observam-se alvéolos íntegros (a) ocupando a maior parte do parênquima pulmonar caracterizando um tecido normal (CO-1 e CO-2) e predominância de tecido extra-alveolar com redução aparente da área alveolar (b) no grupo MT (MT-1; MT-2). H.E. 5 X (CO-1; MT-1); 20 X (CO-2; MT2).

Na **figura 7** podem ser observadas artérias pré-acinares do parênquima pulmonar dos grupos experimentais. O grupo controle apresentou estruturas e dimensões arteriais normais. Assim, a túnica íntima dessas artérias mostrou-se bastante delgada, constituída por uma camada única de células endoteliais e quantidade mínima de matriz extracelular. Separando a túnica íntima e média observa-se a lâmina elástica interna. Trata-se de estrutura laminar fenestrada, que permite focalmente o contato de células musculares lisas da média com as endoteliais, além da passagem de substâncias e mesmo de células entre as duas camadas, processo importante na adaptação a estímulos de diversas naturezas. Identifica-se ainda uma lâmina elástica externa, também fenestrada, delimitando externamente a camada média e separando-a da túnica adventícia.

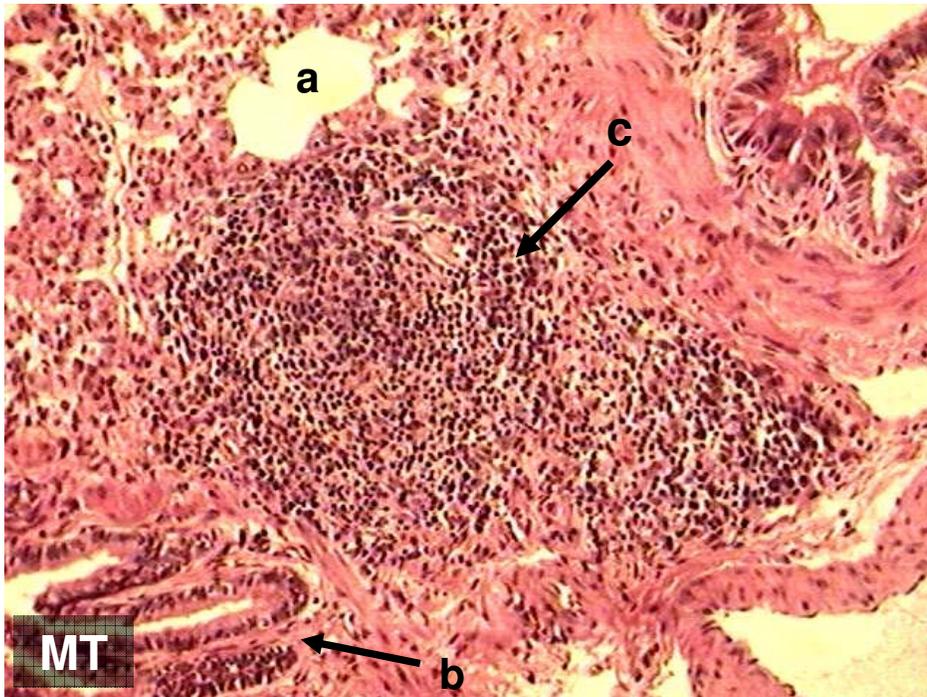
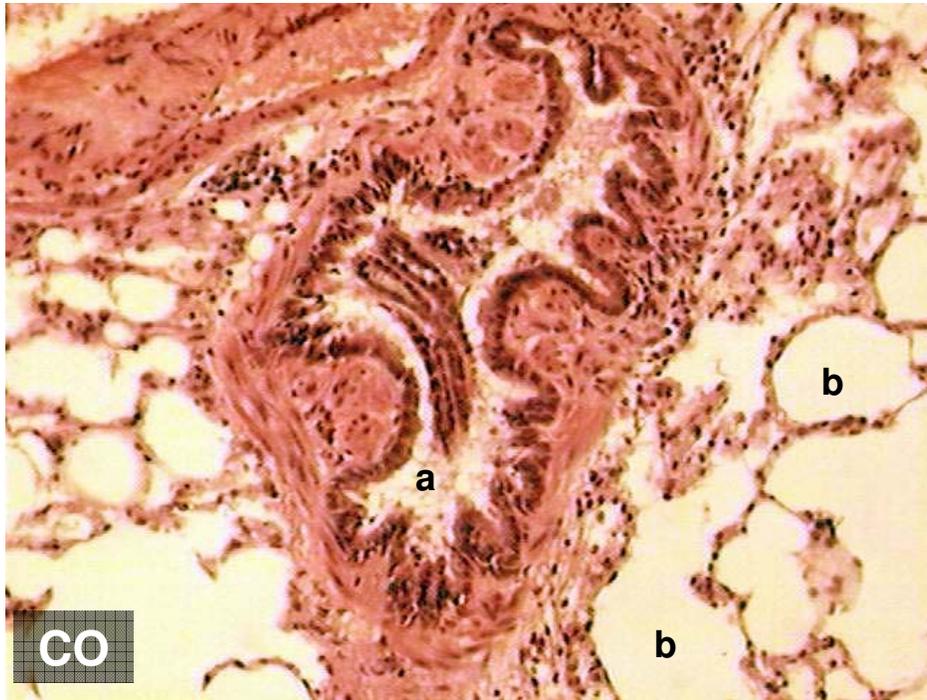
Frente a estímulos injuriantes de diferentes naturezas, os vasos pulmonares sofrem alterações, conhecidas como remodelamento vascular patológico. De forma geral, esses vasos reagem patologicamente da mesma forma que os demais vasos sistêmicos (Newby and Zalstman, 2001). Nossos animais portadores de HAP induzida por monocrotalina, apresentaram hipertrofia da túnica média, espessamento fibroso da adventícia e redução do lúmen vascular (**figura 7**). Resultados semelhantes foram observados por Ito et al. (2000), Kanno et al. (2001) e Schermuly et al. (2003), os quais também estudaram o mesmo modelo experimental. Essa resposta vascular foi consequência provável da ação de substâncias como citocinas e fatores de crescimento que podem proporcionar grandes alterações nas células musculares lisas da túnica média (Tuder et al, 2001). Instala-se, então, um processo de aumento de espessura dessa camada, com hipertrofia das suas células além de aumento na deposição de componentes da matriz extracelular como colágeno, elástica e proteoglicanos (Rabinovitch, 1999; 2001), tornando o vaso mais resistente e reativo. Morfologicamente, observou-se em animais experimentais e em humanos, que também ocorre aumento na área da túnica adventícia, pela deposição de colágeno e fibras elásticas (Chazova, 1995; Stenmark, 1997), absorvendo, assim, a maior pressão do leito vascular.



**Figura 7.** Fotomicrografia de artéria do parênquima pulmonar com hipertrofia da túnica média (a), espessamento fibroso da adventícia (b) e redução do lúmen (c) do grupo com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina (MT), em relação ao grupo controle (CO) que apresenta estruturas e dimensões arteriais normais. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). H.E. 20 X.

Além disso, as células musculares lisas da túnica média sofrem outro tipo de modificação, crucial para que possam produzir substâncias como as da matriz extracelular: é o processo de desdiferenciação, onde passam do fenótipo contrátil para o secretor. Esse processo é também mediado pelos mesmos fatores de crescimento gerados nas células endoteliais e pode ser evidenciado morfológicamente pelo aumento das organelas responsáveis pela síntese protéica e pela diminuição da concentração da actina específica do músculo liso (Aiello et al., 1994). As próprias células musculares lisas também geram substâncias promotoras de proliferação celular, atuando de forma autócrina e parácrina. Produzem ainda metaloproteinases, que quebram as proteínas da matriz extracelular e propiciam a migração de algumas das células desdiferenciadas para a túnica íntima, através de espaços criados na lâmina elástica interna. Uma vez na íntima, essas células diferenciadas, acabam por promover a oclusão parcial ou total da luz vascular por deposição de proteínas da matriz.

Na **figura 8**, os animais portadores de HAP apresentaram infiltração leucocitária adjacente a bronquíolos e alvéolos, em relação ao grupo controle. Kanno et al. (2001), também encontraram esta forma de lesão no tecido pulmonar de ratos portadores de HAP induzida por monocrotalina. Há fortes evidências de que a inflamação tem papel preponderante no desenvolvimento e manutenção das lesões morfológicas das artérias induzidas pela hipertensão pulmonar de diferentes etiologias (Tuder et al, 1994; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2005). De fato, principalmente nos casos da chamada “hipertensão arterial pulmonar primária”, mas também nos que acompanham outras condições, encontram-se focalmente lesões do tipo arterite, caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório misto (linfócitos, histiócitos e polimorfonucleares) permeando a parede do vaso. Admite-se que citocinas liberadas pelas células inflamatórias participem do processo de remodelamento vascular, promovendo proliferação celular.



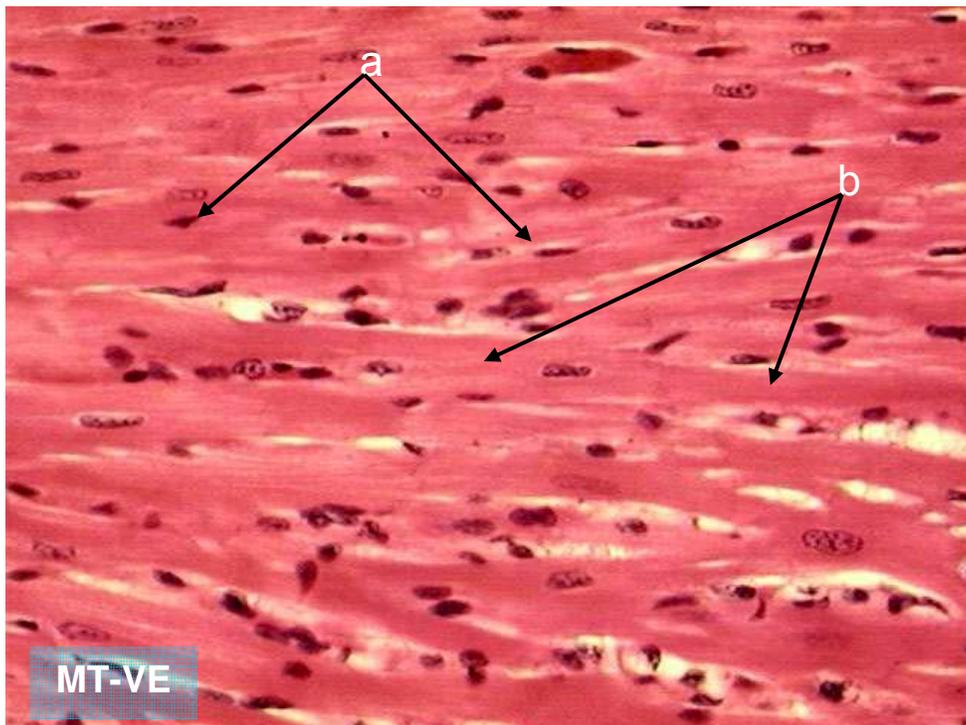
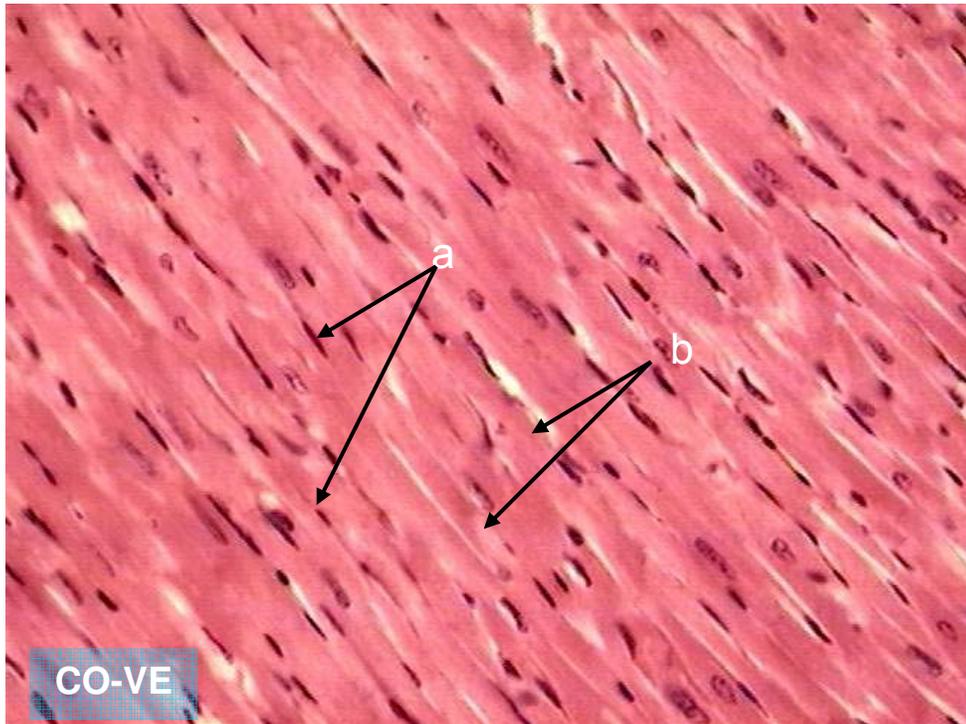
**Figura 8.** Fotomicrografia do tecido pulmonar de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de Hipertensão arterial pulmonar induzida por MCT (MT). Observam-se bronquíolo (a) e alvéolos (b) aparentemente normais (CO). Nota-se infiltração leucocitária (c) adjacente a bronquíolos (b) e alvéolos (c) nos animais tratados com monocrotalina (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). H.E. 20 X.

### IV.2.3. Morfologia Cardíaca

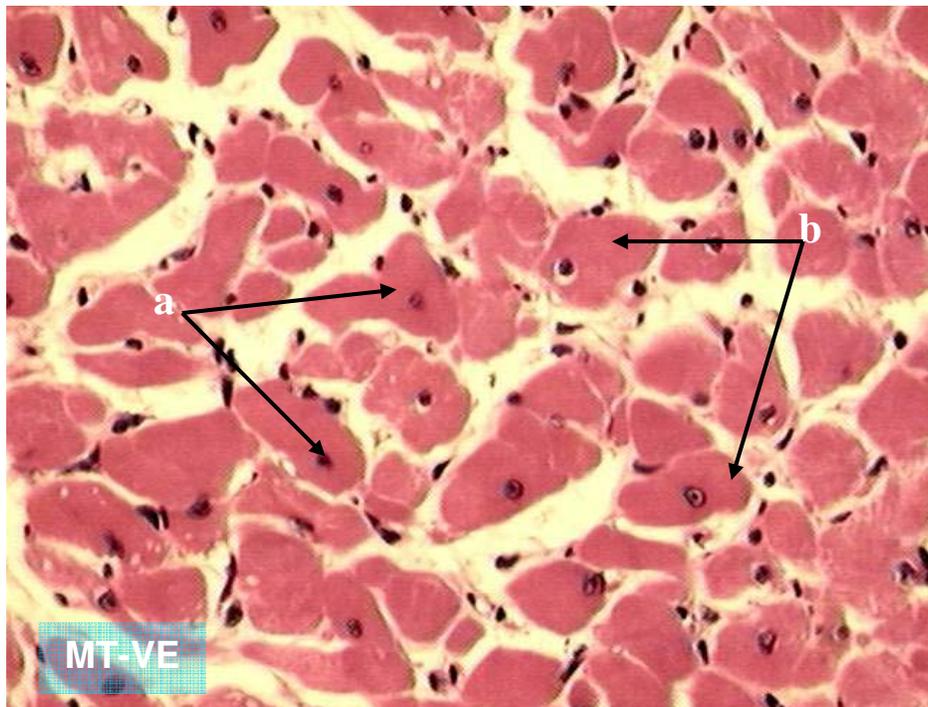
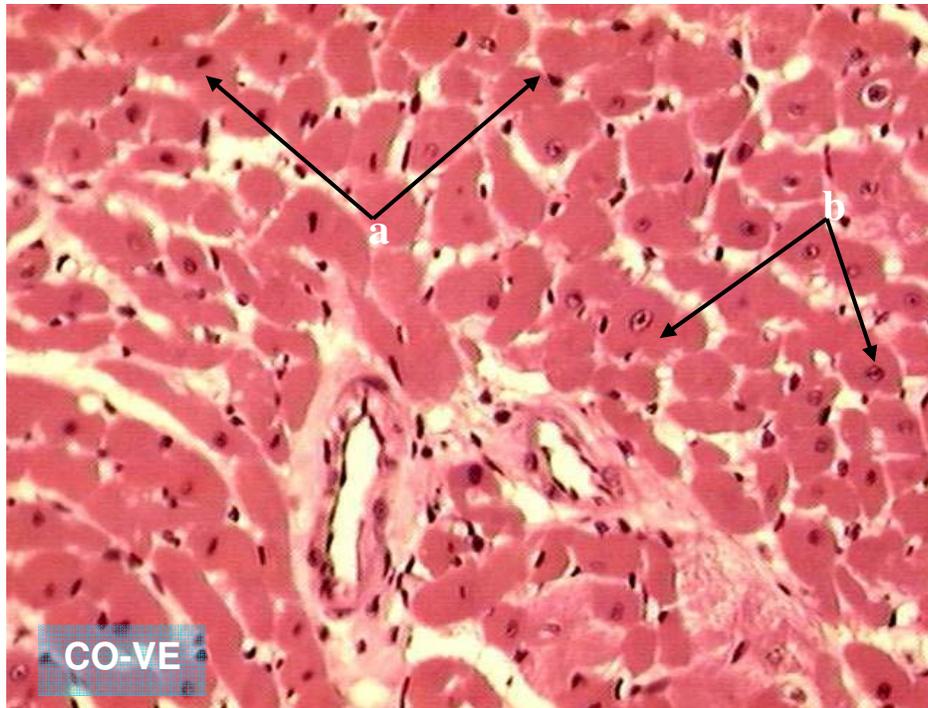
As **figuras 9 e 10** mostram fotomicrografias de corte longitudinal e transversal, respectivamente, do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos controle e portadores de HAP. Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente e feixes de fibras íntegras, com dimensões semelhantes entre os grupos. Por outro lado, as fotomicrografias de corte longitudinal e transversal do ventrículo direito de ratos dos grupos controle e portadores de HAP apresentam núcleos íntegros dispostos periféricamente e feixes de fibras íntegras, porém com hipertrofia no grupo MT (**figuras 11 e 12**), quantificada pela medida da área dos cardiomiócitos dos grupos experimentais (**figura 13**).

Essa hipertrofia observada em nossos animais aumentaram a duração do complexo QRS, desviaram o eixo elétrico ventricular para a direita e colaboraram para o prolongamento do intervalo QT nos animais tratados com monocrotalina, como veremos adiante. Tais alterações eletrocardiográficas indicam alterações da atividade elétrica cardíaca, as quais podem estar associadas à prováveis disfunções contráteis. De fato, Xiaowei e David (2008), observaram que o quadro hipertrófico conseqüente à HAP induzida por monocrotalina acarretou disfunção endotelial em artérias coronárias induzindo remodelamento vascular e isquemia cardíaca. A restrição do fluxo sanguíneo coronariano, por sua vez, pode comprometer a atividade elétrica e contrátil do coração.

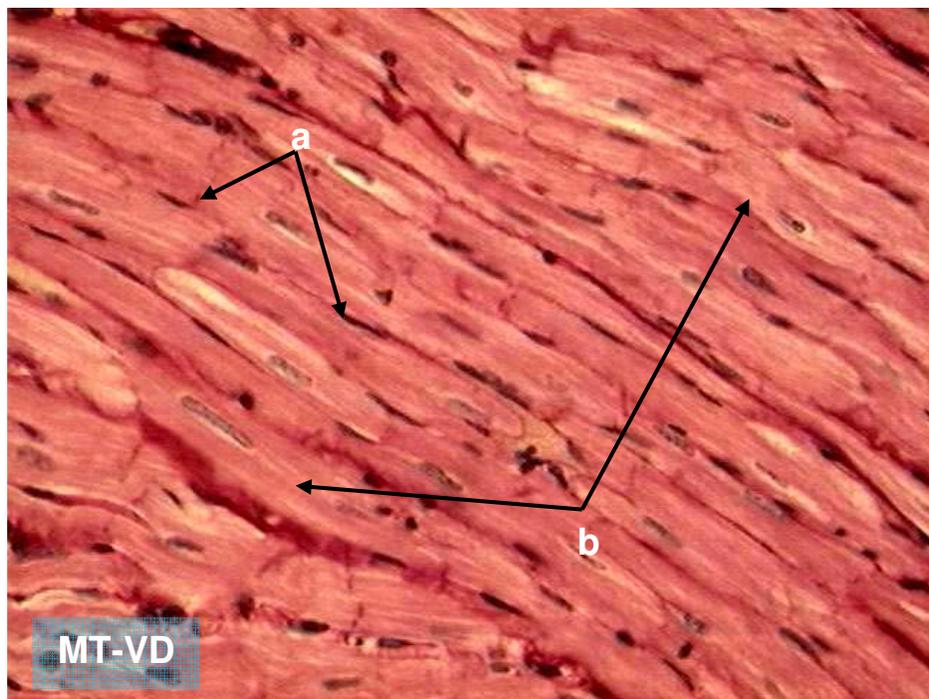
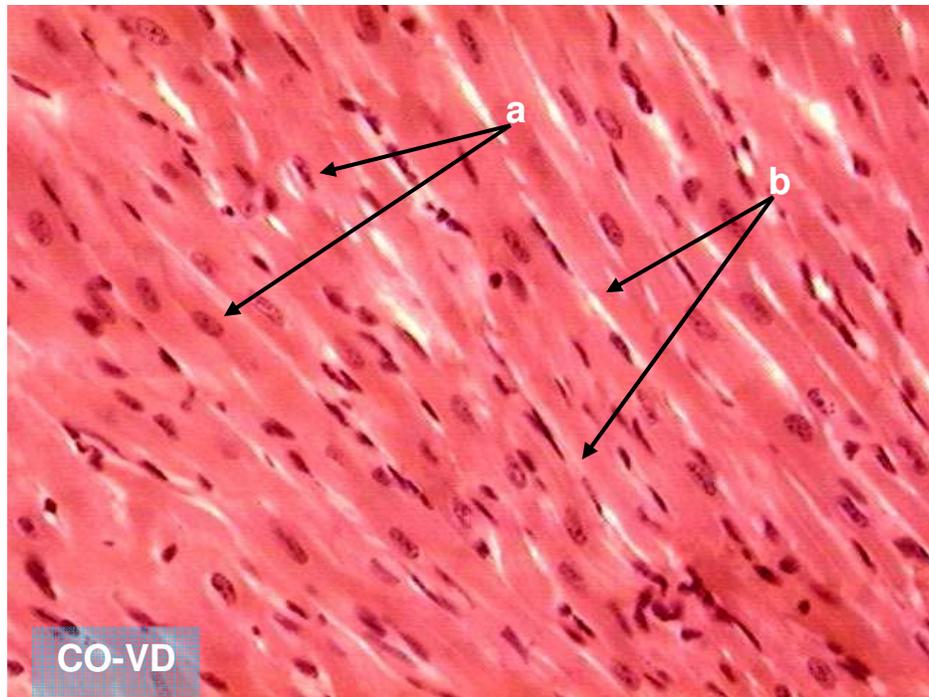
Assim, a hipertrofia miocárdica é considerada um mecanismo compensatório decorrente de processos adaptativos do tecido cardíaco à sobrecarga de trabalho. Dependendo do grau ou duração da sobrecarga imposta ao coração, a hipertrofia ventricular pode progredir de um estágio compensatório para um prejuízo da função sistólica ou diastólica culminando com a instalação da doença cardíaca. Essa transição é caracterizada por alterações na composição da matriz extracelular, no metabolismo energético, na responsividade dos receptores adrenérgicos, nas proteínas contráteis, nas concentrações de cálcio nos cardiomiócitos, na excitação e condução elétrica e na expressão gênica (LekanneDeprez et al., 1998; Spinale et al., 2002; Van der Laarse, 2002; Kogler et al., 2003; Buermans et al., 2005; Schott et al., 2005).



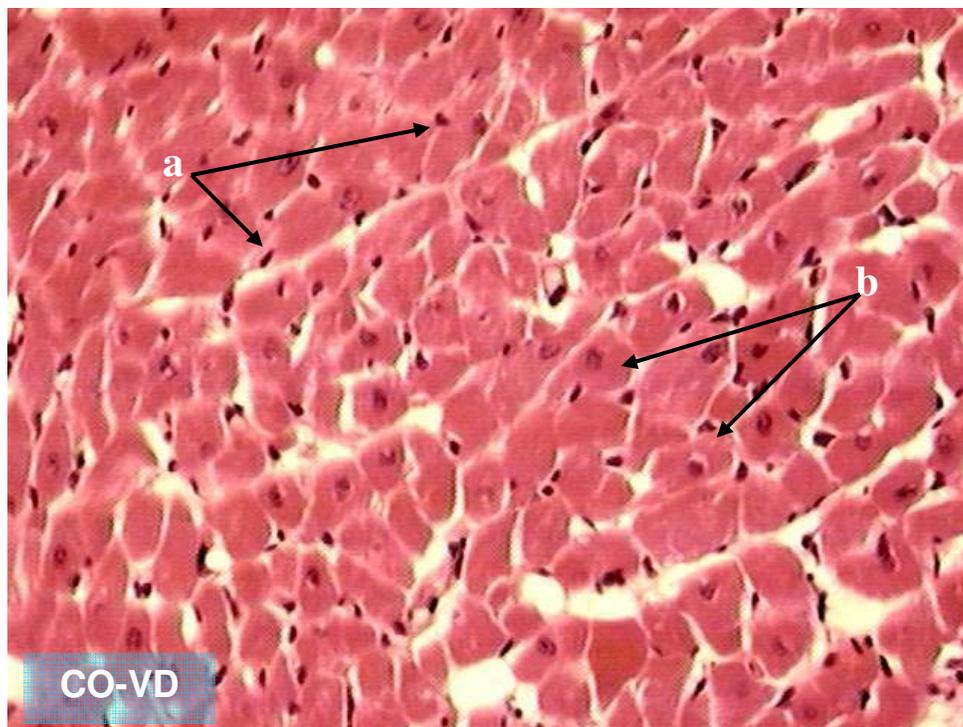
**Figura 9.** Fotomicrografia de corte longitudinal do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente (a) e feixes de fibras íntegras (b). HE. 40 X.



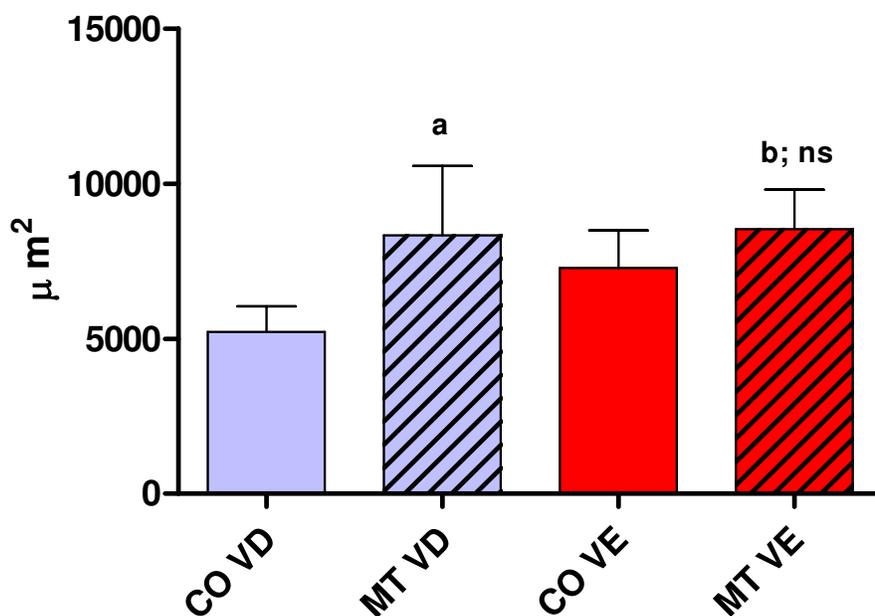
**Figura 10.** Fotomicrografia de corte transversal do ventrículo esquerdo de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente (a) e feixes de fibras íntegras (b). HE. 40 X.



**Figura 11.** Fotomicrografia de corte longitudinal do ventrículo direito de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente (a) e feixes de fibras íntegras (b) com aumento da espessura no grupo MT (c). HE. 40 X.



**Figura 12.** Fotomicrografia de corte transversal do ventrículo direito de ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Observam-se núcleos íntegros dispostos perifericamente (a) e feixes de fibras íntegras (b) com aumento do diâmetro do cardiomiócito no grupo MT (c). HE. 40 X.



**Figura 13.** Área dos cardiomiócitos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Sendo: controle ventrículo direito (CO VD); monocrotalina ventrículo direito (MT VD); controle ventrículo esquerdo (CO VE); monocrotalina ventrículo esquerdo (MT VE). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey ; ( $p < 0,05$ ): **(a)** CO VD X MT VD, **(b)** CO VE X MT VE, **(ns)** não significativo; ( $n = 5$ ).

O tratamento de ratos com monocrotalina constitui-se em um modelo que frequentemente é utilizado para estudo de alterações funcionais, estruturais e moleculares induzidas pela hipertrofia compensatória ou patológica do ventrículo direito (Marleen et al, 2006).

Monocrotalina induz alterações pulmonares, como visto anteriormente, características do quadro de hipertensão pulmonar, a qual está associada com o desenvolvimento de hipertrofia compensatória ventricular direita, podendo progredir para cardiomiopatia hipertrófica em poucas semanas, dependendo da dose e da idade dos animais (Werchan et al., 1989; Buermans et al., 2005).

No modelo experimental utilizado neste trabalho, a monocrotalina induziu hipertrofia ventricular direita em apenas 28 dias. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Buermans et al., (2005), Lourenço et al., (2006) e Marleen et al., (2006) os quais induziram hipertrofia ventricular direita em ratos quatro semanas após a administração de monocrotalina em baixa (30 mg/Kg de peso corpóreo), intermediária (60 mg/Kg peso corpóreo) e alta concentração (80 mg/Kg de peso corpóreo), respectivamente.

É importante notar que a hipertrofia cardíaca induzida por monocrotalina não implica em aumento da força de contração do coração, a qual seria necessária para manter a função cardíaca em animais portadores de HAP. Tal fato pode ser atribuído à redução da densidade de receptores adrenérgicos devido à *downregulation* dos receptores adrenérgicos no modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina (Leineweber et al, 2002; Leineweber et al, 2003). Entretanto, outros estudos serão necessários para esclarecer os aspectos funcionais e moleculares envolvidos na resposta hipertrófica ventricular à hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina, como pretendemos avaliar futuramente determinando pressões e volumes ventriculares, débito cardíaco e biomarcadores de doença cardíaca.

### **IV.3. Parâmetros eletrocardiográficos (ECG)**

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2005), tem se verificado uma tendência ao aperfeiçoamento de técnicas não invasivas para exames diagnósticos, possibilitando o diagnóstico de determinadas patologias sem a necessidade de exames invasivos. No que diz respeito à hipertensão pulmonar é importante enfatizar que a avaliação do paciente com uso de metodologia não invasiva satisfaz alguns aspectos, porém não todos. Neste sentido, existe consenso na literatura sobre o fato de que, tanto a definição do estado hipertensivo como os critérios da resposta da circulação pulmonar a estímulos vasodilatadores, são baseados estritamente em medidas hemodinâmicas invasivas. Entretanto, a metodologia não invasiva vem ganhando espaço progressivo na avaliação desses pacientes, pela simplicidade e conforto na obtenção dos resultados, quando medidas repetidas se fazem necessárias ao longo do tempo para o acompanhamento de um caso específico. Os métodos não invasivos ainda necessitam de aperfeiçoamento, porém demonstram que há uma tendência à substituição de exames por técnicas cada vez menos invasivas, valorizando a simplicidade e praticidade na realização dos mesmos. Dessa forma, o eletrocardiograma, por exemplo, pode ser um método auxiliar extremamente útil no prognóstico do tratamento de indivíduos portadores de hipertensão arterial pulmonar.

Embora alterações eletrocardiográficas correspondentes à sobrecarga ventricular direita estejam presentes na maioria dos indivíduos portadores de HAP, o ECG, para alguns autores, tem sido considerado pouco sensível como método diagnóstico para essa doença (McGoon et al., 2004). Uma possível explicação para tal fato pode ser atribuída à ampla faixa de valores normais para o ECG como, por exemplo, a variação normal para o eixo elétrico ventricular ( $-30^{\circ}$  a  $+90^{\circ}$ , ou mesmo  $+100^{\circ}$ ), dependendo do critério utilizado (Henkens et al., 2008-A).

Contudo, recentes estudos em ratos e humanos têm demonstrado que doenças que levam ao aumento da pressão ventricular direita causam significativas alterações nas propriedades elétricas do miocárdio, as quais são

detectadas pelo eletrocardiograma convencional de 12-derivações (Henkens et al., 2007; Costa et al., 2008; Henkens et al., 2008-B).

Os registros eletrocardiográficos realizados em ratos variam de acordo com o tipo de técnica de gravação utilizada, presença ou ausência de anestesia, tipo de agente anestésico, posição do animal durante o registro, características do amplificador e velocidade e amplitude do registro. A idade, o peso, o sexo e a forma de contenção do animal são fatores que também precisam ser considerados para o registro e análise do eletrocardiograma de rato.

O rato apresenta eletrocardiograma de difícil interpretação patológica em face de sua peculiar morfologia e alta frequência cardíaca, quando analisado isoladamente, de forma não seriada, ao longo de qualquer processo patológico que pode acometer o coração. A orientação anatômica do coração do rato é semelhante à do homem, ou seja, os ventrículos direito e esquerdo encontram-se na posição anterior e posterior do coração. Conseqüentemente, as forças iniciais de ativação (despolarizantes) do músculo cardíaco deslocam-se da esquerda para a direita do coração; entretanto, são de baixa amplitude e, dependendo da posição do coração, são responsáveis pela forma aguda da onda Q.

Por outro lado, o vetor de ativação do ápice ventricular apresenta sentido da direita para a esquerda e de cima para baixo, evidenciado pela maior amplitude da onda R em todas as derivações, apresentando-se negativa em aVR. A última região do coração do rato a ser ativada é a base do ventrículo esquerdo representada pela presença invariável de uma onda S, de baixa amplitude, em todas as derivações. A onda Q pode apresentar-se de forma rudimentar ou ausente. Ocasionalmente, uma discreta onda Q é observada em aVL. A onda S, por outro lado, é registrada em quase todas as derivações. A onda R é sempre registrada invertida na derivação aVR. .

O eixo elétrico ventricular mostra-se na posição vertical, indicando que o ápice do coração está próximo da linha média do esterno (entre +60° e +90°). Os valores do eixo podem ser calculados tendo-se como referências o complexo QRS e onda T, segundo orientação espacial do sistema hexaxial. Assim, tem-se

observado, em ratos normais, valores de  $+49.60^\circ \pm 22.6^\circ$  para a orientação espacial do vetor correspondente ao complexo QRS no plano frontal.

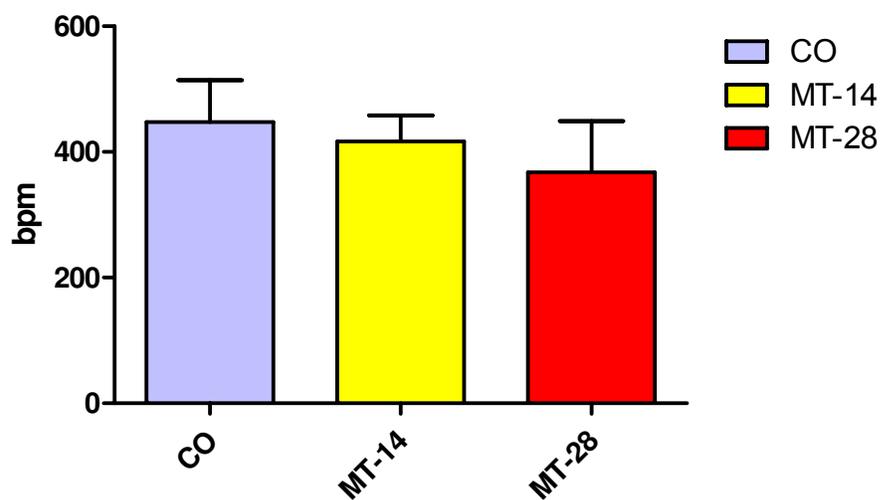
Em contraste com o modelo de repolarização do ventrículo humano, o processo de repolarização dos ventrículos do rato apresenta um componente muito rápido, sendo que o pico da onda T ocorre imediatamente após a onda R, proporcionando falsa elevação do segmento S-T. Deve-se destacar que a o segmento S-T curto ou mesmo ausente, se deve à repolarização ventricular no coração do rato começar antes mesmo que a despolarização ventricular tenha terminado.

Deve ser lembrado que o rato apresenta, normalmente, alta frequência cardíaca e, sob estresse físico ou mental, essa frequência pode aumentar ainda mais sendo, portanto, essencial que a repolarização seja suficientemente rápida para a continuidade do processo normal de excitação/contração do coração. Conseqüentemente, medidas da duração da onda T e do intervalo Q-T podem sofrer variações num mesmo registro de ECG. Dessa forma, o segmento Q-T pode medir 80 ms em DI, 100 msec em DII e 75 ms em DIII (Kumar et al., 1995; Chu et al., 2001).

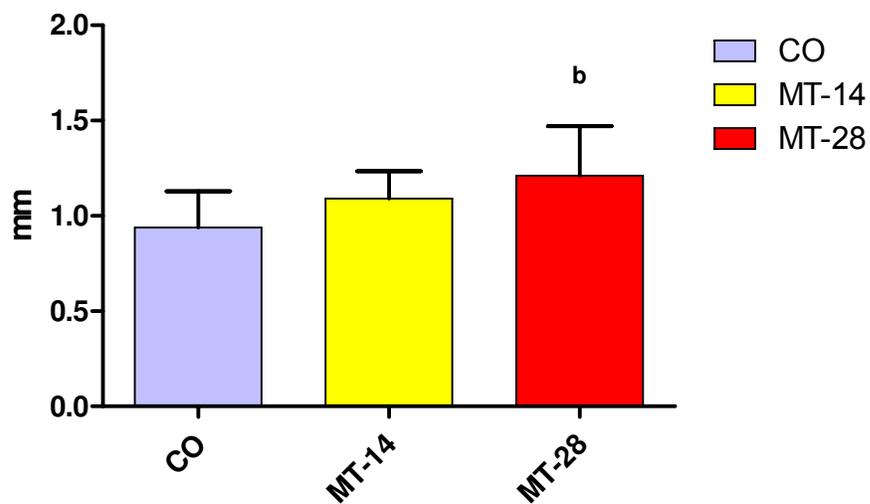
Dentre os parâmetros eletrocardiográficos registrados pelo ECG, aqueles que se mostram mais sensíveis às variações cardiovasculares induzidas pela HAP são: onda P *pulmonale* (apiculada maior amplitude em DII), duração do complexo QRS e eixo elétrico ventricular. Quanto maiores os níveis pressóricos na circulação arterial pulmonar, maior a sensibilidade do eletrocardiograma na detecção destes parâmetros (Henkens et al., 2008-B). Pelo fato da existência de alterações nas dimensões das câmaras cardíacas produzidas pela HAP, decidimos determinar, também, os intervalos QT e QTc para avaliação do risco de morte súbita em função de prováveis alterações na condução elétrica em ventrículos hipertróficos.

Com relação à frequência cardíaca, os grupos CO e MT apresentaram ritmo sinusal não diferindo entre si nos períodos estudados, apesar da tendência de redução no grupo MT (**figura 14**). Segundo Usui et al. (2006), animais portadores de HAP apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de substâncias

excitatórias da função cardíaca, como noradrenalina e angiotensina II, o que poderia ter provocado efeito cronotrópico positivo nos animais do grupo MT, o que não ocorreu neste experimento. Acreditamos que tal fato possa ser conseqüente, provavelmente, à redução do número de receptores adrenérgicos promovida pela HAP, o que justificaria a tendência de redução da freqüência cardíaca observada nos nossos animais tratados com monocrotalina (Leineweber et al., 2002 e Leineweber et al., 2003).



**Figura 14.** Frequência Cardíaca (batimentos por minuto) dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28: (n = 10).



**Figura 15.** Amplitude da onda P dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Teste t de Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28: (n = 10).

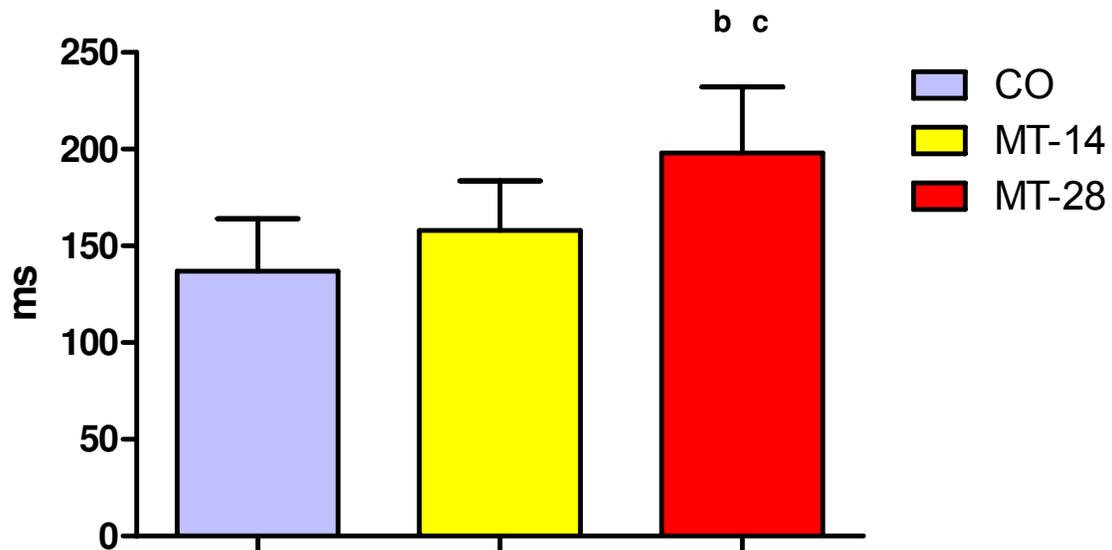
De fato, está relatado na literatura que ratos portadores de HAP induzida por monocrotalina apresentaram diminuição do número de receptores alfa e beta adrenérgicos, principalmente no ventrículo direito, reduzindo a resposta dos tecidos cardiovasculares a substâncias agonistas simpáticas (Leineweber et al, 2003; Seyfarth et al, 2000).

Como veremos adiante, a redução da resposta vascular à noradrenalina na artéria pulmonar dos ratos do grupo MT suporta nossa hipótese, estando em acordo com os autores que verificaram que a exposição prolongada dos receptores cardiovasculares  $\alpha$  a altas concentrações deste neurotransmissor ocasiona *down regulation* desses receptores, neste mesmo modelo experimental (Oriowo et al, 2003; Dhein et al, 2002; Shubat et al, 1989).

Quanto à ativação elétrica atrial, nossos resultados mostraram que os animais portadores de HAP apresentaram aumento significativo na amplitude da onda P na derivação DII, ao final do período experimental (**figura 15**). Acreditamos que a onda P teve sua amplitude aumentada na derivação DII como resultado da progressiva hipertrofia ventricular direita, como visto anteriormente, sobrecarregando o lado direito do coração e, provavelmente, prejudicando a função diastólica cardíaca dos ratos portadores de HAP.

Nossos resultados são corroborados por Karliner et al (1985), que verificaram aumento da amplitude da onda P em DII em alpinistas submetidos a elevadas altitudes e que desenvolveram hipóxia induzida por HAP. Henkens et al (2008-A; 2008-B) e Ivo et al (2008) destacam, ainda, a importância da análise eletrocardiográfica da onda P para o prognóstico do tratamento de pacientes portadores de hipertensão arterial pulmonar.

Com relação à ativação elétrica ventricular, os resultados mostraram um aumento da duração do complexo QRS nos ratos com HAP, ao final do período experimental (**figura 16**) devido, provavelmente, à hipertrofia ventricular direita verificada anteriormente nos animais portadores de HAP. Nossos resultados são corroborados por Henkens et al (2007), os quais ponderaram que alterações na magnitude do QRS podem ser explicadas pelo aumento da contribuição do ventrículo direito para a atividade despolarizante ventricular.



**Figura 16.** Duração do Complexo QRS dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; Teste t e Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; (n = 10).

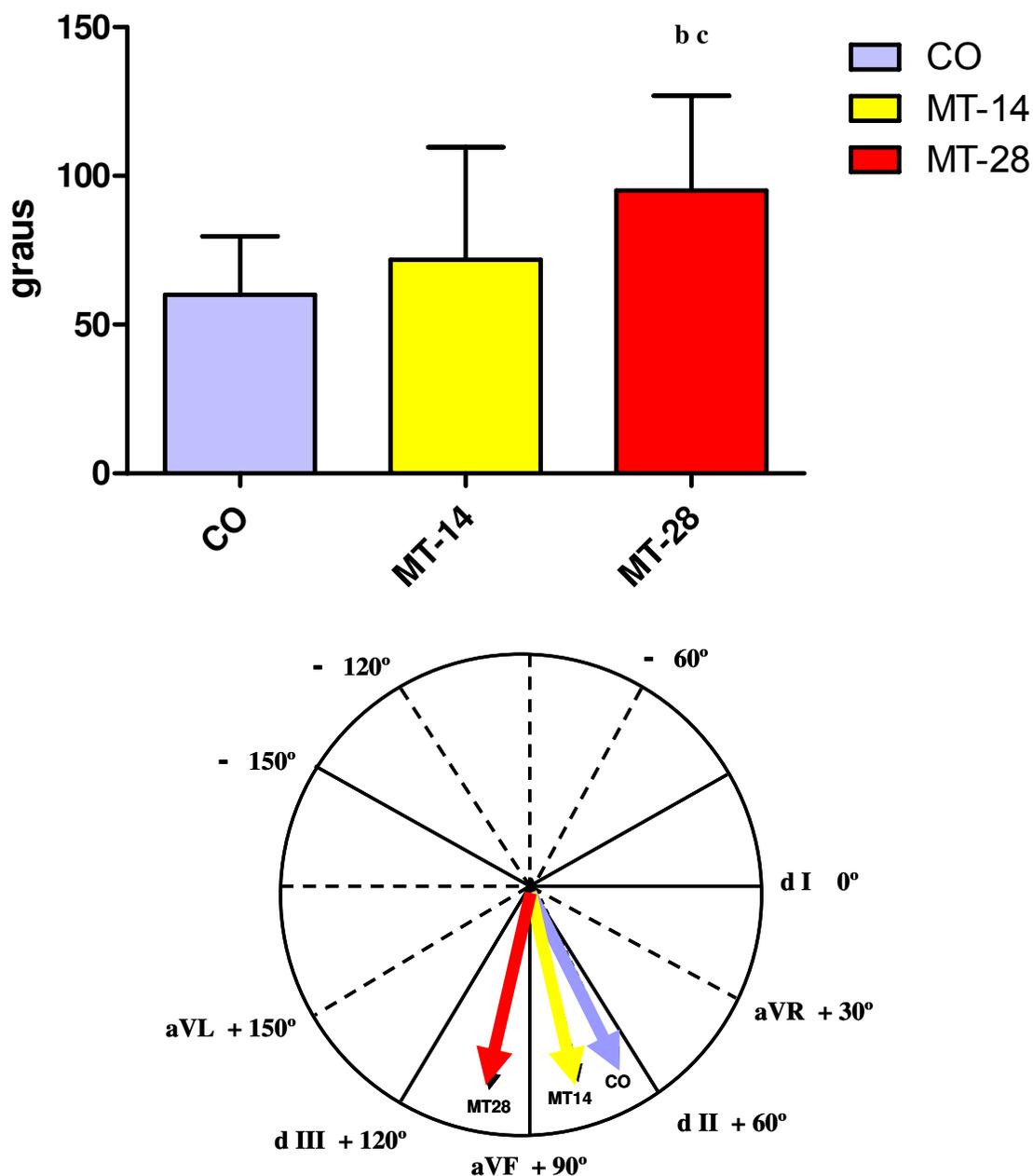
A determinação do eixo elétrico médio ventricular (SÂQRS) nos permitiu verificar o grau da hipertrofia em nossos animais (**figura 17**). Assim, observamos significativo desvio do eixo para a direita nos animais portadores de HAP resultante da hipertrofia do ventrículo direito, como anteriormente verificada pela análise morfológica.

Nossos resultados estão de acordo com autores que também verificaram desvio do eixo elétrico ventricular para a direita em pacientes (Bossone et al., 2003; Folino et al., 2003) e em ratos (Henkens et al., 2007; 2008-A; 2008-B) portadores de hipertensão arterial pulmonar

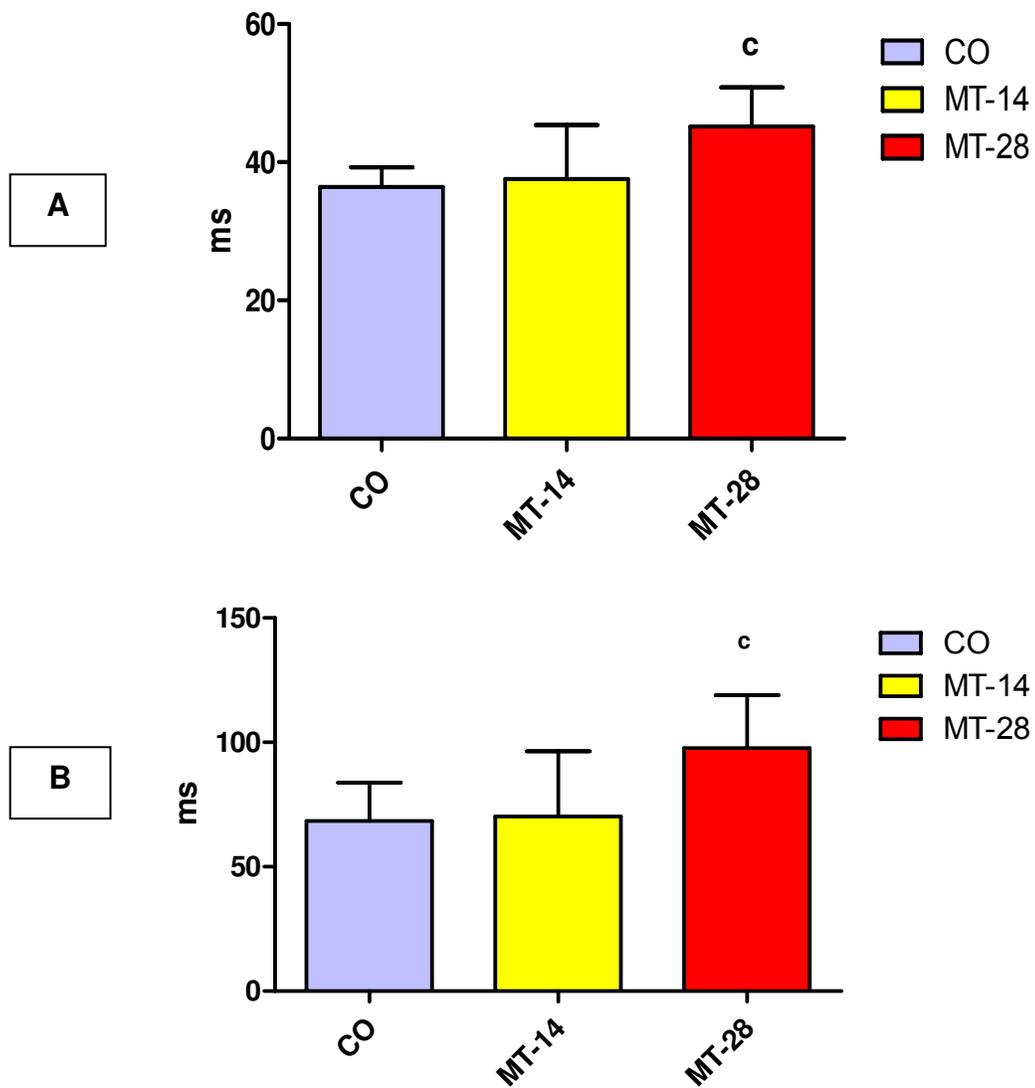
O atraso na condução intraventricular verificada pelo aumento da duração do complexo QRS, em consequência da hipertrofia do ventrículo direito, nos animais com HAP pode acarretar arritmias ventriculares importantes. Com esse propósito, avaliamos o intervalo QT do eletrocardiograma, bem como o ajuste desse intervalo em função da frequência cardíaca (QTc).

Os resultados dos intervalos QT e QTc encontram-se na **figura 18**. Observamos que a tendência de aumento do QT nos animais do grupo MT mostrou-se significativa quando corrigido pela frequência cardíaca (QTc), como também foi observado no estudo de Micheli et al. (2006), predispondo esses animais à morte súbita decorrente de arritmia ventricular. Em concordância, Satoh et al. (2004), atribuíram a morte súbita de uma paciente à hipertensão pulmonar.

Embora não tenha sido possível explicar neste estudo o mecanismo pelo qual a hipertensão arterial pulmonar promoveu prolongamento do intervalo QT, acreditamos que o aumento tenha sido causado por prejuízo na repolarização do potencial de ação ventricular. Nossos resultados e proposição são corroborados por Uchino et al. (2008), os quais também encontraram prolongamento do intervalo QT em ratos tratados com monocrotalina e sugeriram a hipótese de alterações no funcionamento de canais voltagem-dependentes responsáveis pelo influxo de sódio e de canais transitórios de potássio pelos quais ocorre o efluxo desse íon.



**Figura 17.** Eixo Elétrico Ventricular (SÂQRS) no plano frontal dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; Teste de Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; ( $n = 10$ ).

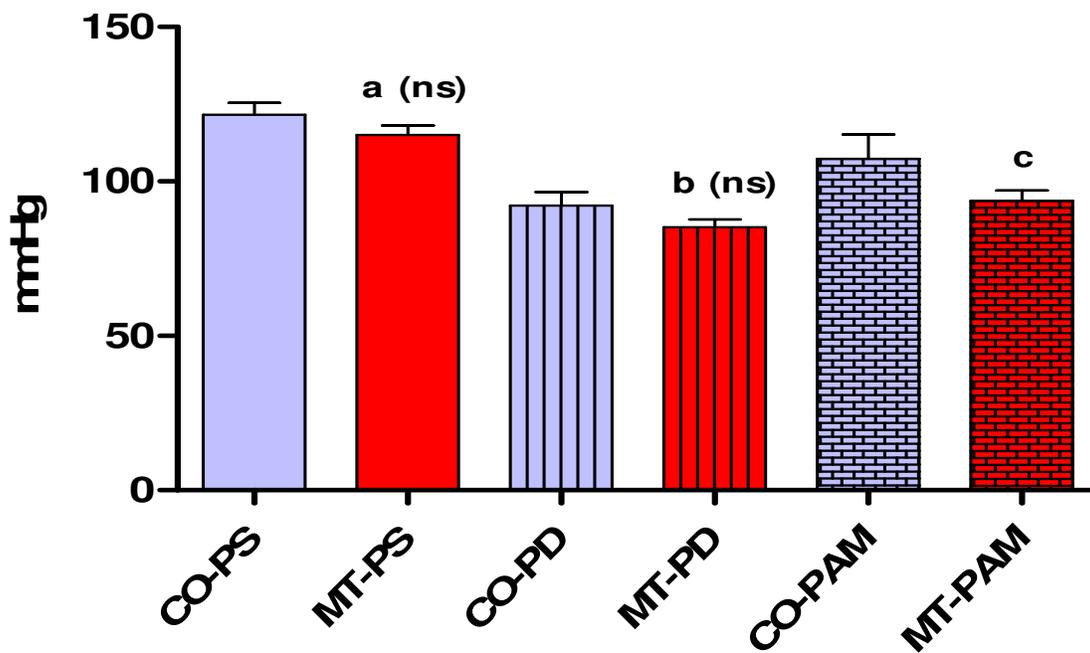


**Figura 18.** Intervalos QT (A) e QTc (B) dos ratos dos grupos controle (CO) e portadores de HAP aos 14 (MT-14) e 28 dias (MT-28) após a administração de monocrotalina. A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; Teste t de Student ( $p < 0,05$ ): (a) CO X MT-14; (b) CO X MT-28; (c) MT-14 X MT-28; (n = ...)

De fato, doença cardíaca em humanos e em modelos animais está associada, entre outros fatores, ao prolongamento da duração do potencial de ação decorrente de *down regulation* dos canais transitórios de potássio (Kääh et al, 1998), aumentando, assim, o período de repolarização ventricular, detectado pelo prolongamento do intervalo QT do eletrocardiograma e associando, conseqüentemente, a hipertensão arterial pulmonar ao risco de morte súbita.

#### **IV.4. Pressão arterial sistólica (PS), diastólica (PD) e média (PAM).**

Como pode ser visto na **figura 19**, as pressões sistólica e diastólica não foram diferentes entre os grupos estudados. Com relação às pressões sistólica e diastólica, nossos resultados são corroborados por Mawatari et al (2007), os quais não verificaram alterações pressóricas em ratos portadores de HAP. Entretanto, nossos animais tratados com monocrotalina tiveram redução significativa da pressão arterial média. Esses resultados estão de acordo com Chen et al (2001), os quais também verificaram redução da pressão arterial média sem alterações significativas nas pressões sistólica e diastólica de animais portadores de hipertensão arterial pulmonar. O termo *pressão média* refere-se à pressão média em relação ao tempo. De uma forma simplificada, a pressão arterial média pode ser estimada acrescentando-se 1/3 da pressão de pulso (PS – PD) à pressão diastólica. Acreditamos que os menores valores, embora não significativo, da PS e da PD, foram determinantes na significativa redução da PAM nos animais portadores de HAP. Estudos complementares serão necessários para avaliarmos se este resultado poderia significar maior prejuízo à perfusão tecidual já comprometida, principalmente nos pulmões, pela ação tóxica da monocrotalina no sistema vascular.



**Figura 19.** Pressão arterial sistólica (OS), diastólica (PD) e média (PAM) dos animais dos grupos controle (CO) e portadores de HAP (MT), ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; Teste t de Student; ( $p < 0,05$ ): **(a)** CO-PS X MT-PS, **(b)** CO-PD X MT-PD, **(c)** CO-PAM X MT-PAM, **(ns)** não significativo; ( $n = 10$ ).

#### IV.5.Reatividade Vascular das artérias pulmonar e aorta

Neste trabalho demonstramos que os animais que receberam a injeção de monocrotalina para a indução da Hipertensão Arterial Pulmonar apresentaram alterações na reatividade vascular das artérias aorta e pulmonar como conseqüência, provavelmente, do efeito dessa doença sobre o endotélio vascular. De fato, verificamos que os ratos portadores de HAP induzida pela administração de monocrotalina (MT), apresentaram diminuição significativa da resposta vasodilatadora a acetilcolina, tanto na artéria pulmonar (**figura 20-a**) quanto na aorta (**figuras 21-a**), sugerindo redução na produção de NO pelo endotélio.

Por outro lado, no grupo controle (CO), verificamos significativa porcentagem de relaxamento dos anéis das artérias em estudo em resposta a acetilcolina, próxima de 100% (**figuras 20-a e 21-a**), demonstrando que em nossos ensaios as células endoteliais estavam intactas, uma vez que o relaxamento produzido pela ACh depende do NO produzido por estas células.

Nossos resultados estão de acordo com Ito et al. (2000) e Wanstall et al. (2001), os quais, estudando a reatividade das artérias aorta e pulmonar, *in vitro*, também observaram que a acetilcolina (substância que estimula o relaxamento vascular através da ativação da eNOS) promoveu pouco menos que 100% do relaxamento da musculatura vascular lisa de ambas as artérias em animais controle. Além disso, Ito et al. (2000), também destacaram o fato da acetilcolina promover menor efeito na artéria pulmonar, em relação à aorta, em animais controle.

Com relação ao grupo MT, Ito et al. (2000), também observou diminuição da resposta reposta vasodilatadora para a acetilcolina, atribuindo tal fato ao efeito tóxico primário da MCT no endotélio vascular da artéria pulmonar, o que, provavelmente, ocorreu em nossos animais.

Resultados obtidos por Hongo et al. (2005), que analisaram a reatividade das artérias aorta e pulmonar *in vitro* em modelo animal semelhante ao utilizado neste experimento, também observaram redução da reposta vasodilatadora estimulada pela acetilcolina em ambas as artérias, devido à diminuição da

produção de NO endotelial, dentre outros fatores igualmente importantes para o relaxamento vascular, os quais também estão prejudicados na HAP.

De fato, um endotélio saudável além de produzir óxido nítrico (NO) através da NO sintase endotelial sob estímulo da acetilcolina, também produz prostaciclina e fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), contribuindo, assim, para a manutenção do tônus basal da musculatura lisa vascular, compensando forças vasoconstritoras como a das tromboxana e endotelina 1 (Sun e Ku et al., 2005). Esses mesmos autores destacam que alterações na função endotelial podem contribuir para o início e progressão de muitas doenças cardiovasculares.

Entretanto, Gout et al. (1999) e Ku et al. (2005), não encontraram alteração significativa na resposta da aorta à ACh em ratos com HAP, já que a perda da função endotelial é mais pronunciada na artéria pulmonar que na aorta, pois a primeira torna-se mais vulnerável à alterações funcionais e morfológicas induzidas pela Hipertensão Arterial Pulmonar.

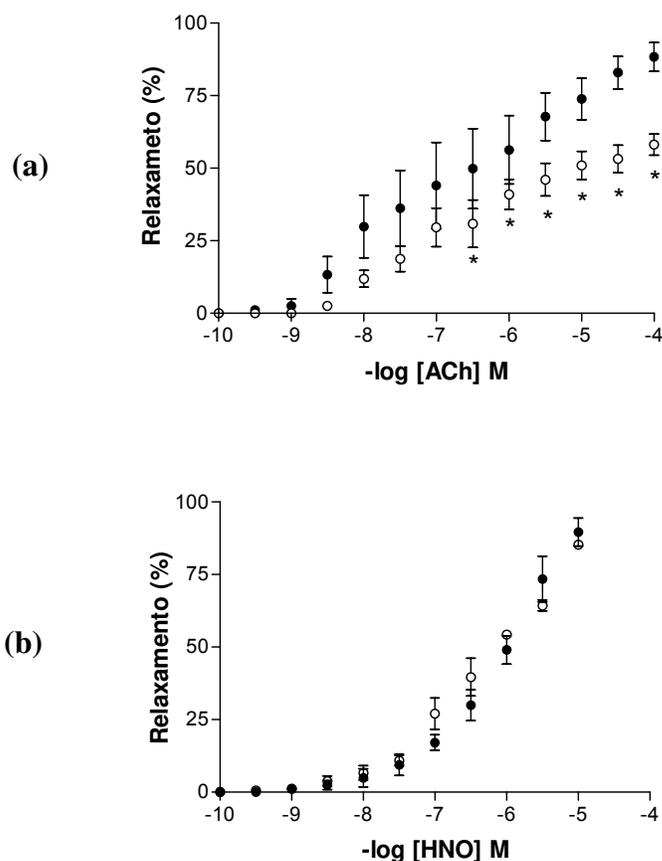
A significativa perda da função endotelial da artéria pulmonar de ratos com HAP induzida por MCT foi observada por Ku et al. (2005), à medida que o relaxamento vascular induzido pela ACh através do estímulo da síntese de NO, foi prejudicado, principalmente a partir da terceira semana após a administração da MCT. Como anteriormente demonstrado, a HAP compromete a função endotelial, prejudica a produção de substâncias vasodilatadoras, interferindo na função cardiovascular. Assim, substâncias vasodilatadoras com ação independente do endotélio podem ser uma alternativa interessante para se verificar a integridade da musculatura lisa vascular, bem como os mecanismos envolvidos no vasorelaxamento, além de serem indicativas de dano endotelial em doenças cardiovasculares como a Hipertensão Arterial Pulmonar.

Para verificar a integridade da musculatura lisa vascular utilizamos o Sal de Angelis (HNO). Nossos resultados mostraram que, o HNO apresentou potente poder vasodilatador tanto no grupo CO quanto no MT, visto que as artérias aorta e pulmonar responderam de forma semelhante nos dois grupos, com 90% na artéria pulmonar (**figura 20-b**) e 100% de relaxamento da artéria aorta (**figuras 21-b**), enquanto que a Ach, avaliada de forma comparativa, apresentou menor efeito

vasorelaxante em relação ao HNO, porque sua ação é dependente do endotélio, atuando indiretamente na função vascular através da estimulação da eNOS nas artérias aorta e pulmonar.

Nossos resultados são corroborados por Irvine et al. (2007), Irvine et al. (2003) e Wanstall et al. (2001), os quais verificaram que o HNO promoveu relaxamento significativo (muito próximo de 100%), de anéis de artéria aorta *in vitro*, demonstrando a eficácia deste doador espontâneo de NO sobre o relaxamento da musculatura lisa vascular. Além disso, estudos *in vitro* realizados por Irvine et al. (2003), concluíram que o Sal de Angelis age de forma independente do endotélio, já que sua capacidade de relaxamento vascular foi semelhante em preparações de anéis de aorta com e sem endotélio.

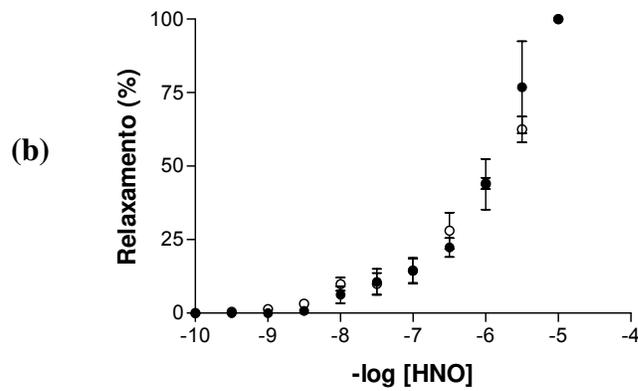
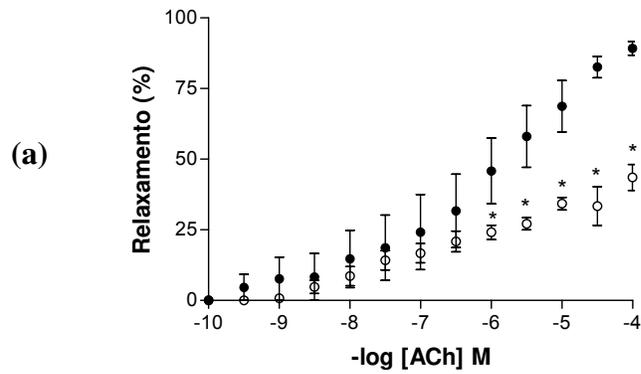
Com os resultados obtidos, inferimos que os animais do grupo MT apresentaram musculatura lisa vascular íntegra, uma vez que se obteve vasorrelaxamento sob a ação do Sal de Angelis. Como a HAP promove disfunção endotelial, concluímos que, de fato, os animais submetidos à administração de MCT apresentaram comprometimento do endotélio ao final do período experimental.



(c)

Grupos	HNO		ACh	
	pD <sub>2</sub>	Rmáx(%)	pD <sub>2</sub>	Rmáx(%)
CO	6,119±0,063 <b>a</b>	89,5±4,97	7,232±0,219	86,86±5,96
MT	6,336±0,106	83,05±2,39 <b>d</b>	6,941±0,154	60±5,05 <b>b</b>

**Figura 20.** CCE a: (a) ACh ( $10^{-10}$  –  $10^{-4}$ M) e ao (b) HNO ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$ M) de anéis de artéria pulmonar isolada, pré contraídos com noradrenalina ( $10^{-6}$  M), de ratos controle (CO = ●) e portadores de HAP (MT = ○). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média; Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT; (n = 6). O painel (c) apresenta os valores pD<sub>2</sub> e Rmáx obtidos nos ensaios de reatividade vascular da artéria pulmonar a ACh e ao HNO. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média; Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) CO ACh x CO HNO, (b) CO ACh x MT ACh, (c) CO HNO x MT HNO e (d) MT ACh x MT HNO; (n = 6).



(c)

Grupos	HNO		ACh	
	pD <sub>2</sub>	R <sub>máx</sub> (%)	pD <sub>2</sub>	R <sub>máx</sub> (%)
CO	5,496±0,226	100±0 <b>a</b>	5,991±0,139	89,21±2,44
MT	5,723±0,133	100±0 <b>d</b>	6,775±0,234	43,56±4,58 <b>b</b>

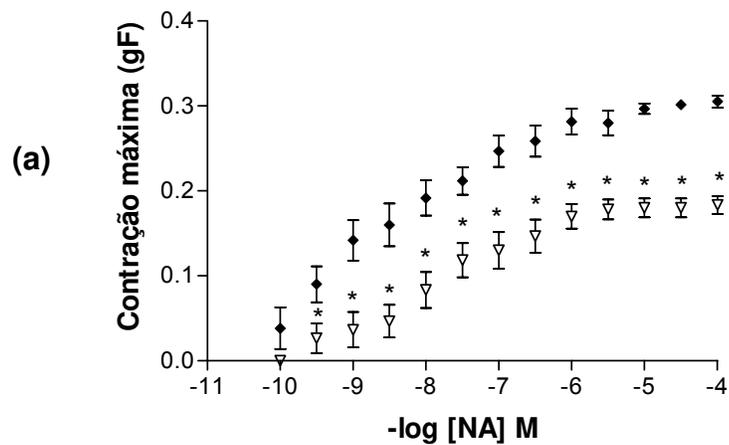
**Figura 21.** CCE a: (a) ACh ( $10^{-10}$  –  $10^{-4}$ M) e ao (b) HNO ( $10^{-10}$  –  $10^{-5}$ M) de anéis de aorta isolada, pré contraídos com noradrenalina ( $10^{-6}$  M), de ratos controle (CO = ●) e portadores de HAP (MT = ○). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média; Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT; (n= 6). O painel (c) apresenta os valores pD<sub>2</sub> e R<sub>máx</sub> obtidos nos ensaios de reatividade vascular da aorta a ACh e ao HNO. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média; Anova seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) CO ACh x CO HNO, (b) CO ACh x MT ACh, (c) CO HNO x MT HNO e (d) MT ACh x MT HNO; (n= 6).

A análise da curva concentração efeito para a noradrenalina nos anéis da artéria pulmonar (**figura 22**), mostrou que a HAP diminuiu a resposta contrátil da musculatura lisa vascular a este fármaco no grupo MT, o que está de acordo com os estudos realizados por Oriowo et al. (2003); Dhein et al. (2002) e Shubat et al. (1989), que também observaram uma diminuição na resposta máxima de contração para noradrenalina plasmática na artéria pulmonar neste mesmo modelo experimental.

Tal fato pode ser decorrente da exposição prolongada dos receptores cardiovasculares  $\alpha$  a altas concentrações deste neurotransmissor ocasionando *down regulation* dos mesmos. Este fato sugere aumento na atividade do sistema nervoso simpático e uma diminuição relativa da atividade vagal, ou seja, prejuízo no relaxamento vascular via ACh (Gout et al., 1999 e Ito et al., 2000), contribuindo, assim, para a vasoconstrição (Sanyal e Ono, 2001).

Por outro lado, a resposta para a noradrenalina na aorta mostrou-se aumentada no grupo MT quando comparado ao grupo CO (**figura 23**), uma vez que Dhein et al. (2002) não observaram alterações na resposta da aorta a este mesmo fármaco. Este resultado, de acordo com a literatura consultada, parece ser um dado novo no estudo da HAP.

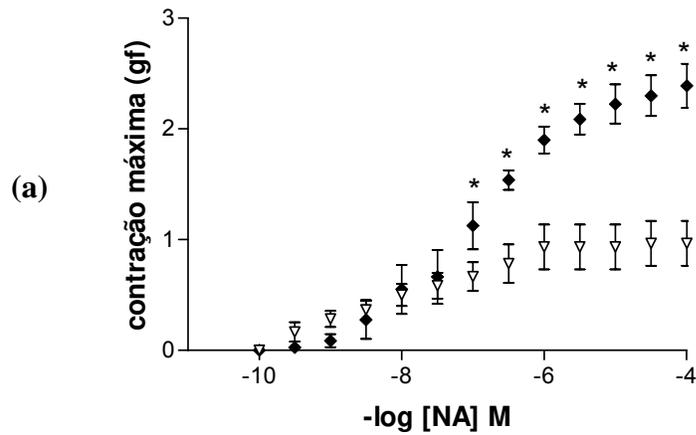
Este aumento na resposta contrátil para noradrenalina na aorta pode ter sido acompanhado por uma *down regulation* dos receptores  $\beta_2$  das células endoteliais, visto que estes receptores promovem vasorelaxamento da musculatura lisa vascular quando a concentração das catecolaminas está muito elevada ( Arribal et al., 1994 e Seyfarth et al., 2000). Também acreditamos que tal fato pode ser decorrente de processos adaptativos do sistema cardiovascular como forma de tentar compensar o déficit cardíaco, principalmente do lado direito do coração, provocado pela HAP. Novos estudos, como a análise de biomarcadores cardíacos e a determinação das pressões e volumes ventriculares serão necessários para esclarecer este fato.



(b)

Grupos	Noradrenalina	
	pD <sub>2</sub>	Rmáx
CO	8,150±0,199	0,30±0,007
MT	7,739±0,122	0,18± 0,01 <b>e</b>

**Figura 22.** CCE a (a) NA - noradrenalina ( $10^{-10}$  –  $10^{-4}$ M) de anéis de artéria pulmonar isolada de ratos controle (CO = ♦) e portadores de HAP (MT = ▽). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média; Teste t Student; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT; (n = 6). O painel (b) apresenta os valores pD<sub>2</sub> e Rmáx obtidos nos ensaios de reatividade vascular da aorta a NA. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média; Teste t Student; ( $p < 0,05$ ): (e) CO x MT; (n = 6).



(b)

Grupos	Noradrenalina	
	pD <sub>2</sub>	Rmáx
CO	8,622±0,555	0,967±0,203
MT	6,934±0,055	2,388±0,0,198

**e**

**Figura 23.** CCE a (a) NA - noradrenalina ( $10^{-10}$  –  $10^{-4}$ M) de anéis de aorta isolada de ratos controle (CO =  $\nabla$ ) e portadores de HAP (MT =  $\blacklozenge$ ). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg de peso corpóreo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; Teste t Student; ( $p < 0,05$ ) para (\*) CO x MT. ( $n = 6$ ). O painel (b) apresenta os valores pD<sub>2</sub> e Rmáx obtidos nos ensaios de reatividade vascular da aorta a NA. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; Teste t Student; ( $p < 0,05$ ): (e) CO x MT; ( $n = 6$ ).

A sensibilidade das artérias aorta e pulmonar, caracterizada pelos valores da  $pD_2$  (50% da resposta máxima para cada agonista) e  $R_{m\acute{a}x}$  (resposta máxima para cada agonista) das CCE, também foi analisada em nosso estudo.

A CCE da artéria pulmonar não apresentou alterações nos valores da  $pD_2$  para o HNO no grupo MT comparado ao grupo CO. Mas em relação à ACh, o HNO apresentou valores dessa variável menor nos grupos CO e MT. Os valores de  $R_{m\acute{a}x}$  da CCE do HNO para o grupo MT, foram significativamente maiores quando comparados a ACh no mesmo grupo. A CCE da noradrenalina na artéria pulmonar apresentou alterações significativas na  $R_{m\acute{a}x}$ , sendo menor no grupo MT em relação ao controle. Estes resultados estão de acordo com Dhein et al. (2002) e Oriowo et al. (2003), os quais obtiveram resultados semelhantes aos nossos para o mesmo modelo experimental.

Em relação à aorta, a  $pD_2$  e a  $R_{m\acute{a}x}$  das CCE relativas à ACh e ao HNO apresentaram valores semelhantes aos encontrados na literatura consultada para os animais controle (Wanstall et al., 2001 e Irvine et al., 2003). No grupo MT, a  $R_{m\acute{a}x}$  mostrou significativamente maior na CCE para o HNO em relação à ACh. Os dados referentes à sensibilidade da aorta à noradrenalina apresentou aumento significativo na  $R_{m\acute{a}x}$  da CCE no grupo MT quando comparado ao CO, resposta diferente daquela publicada previamente na literatura por Dhein et al. (2002).

Portanto, os resultados e discussões obtidos com os experimentos da reatividade vascular, juntamente com os parâmetros anteriormente analisados, evidenciam que os animais que foram tratados com monocrotalina, tornaram-se portadores de HAP 28 dias após a administração da droga, sendo que a resposta contrátil da aorta para a noradrenalina tenha sido diferente daquela descrita pela literatura.

## V. CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos podemos concluir que os animais tratados com monocrotalina apresentaram:

- a) megalocitose hepática, redução da área alveolar pulmonar, hipertrofia da túnica média da artéria do parênquima pulmonar e hipertrofia ventricular direita;
- b) redução do peso corpóreo;
- c) alterações eletrocardiográficas predispondo esses animais ao risco de morte súbita, como resultado da progressiva hipertrofia do ventrículo direito identificada pela análise morfológica;
- d) diminuição significativa na pressão arterial média;
- e) diminuição da resposta vasodilatadora estimulada pela acetilcolina nas artérias pulmonar e aorta em virtude de disfunção endotelial induzida pela monocrotalina;
- f) resposta máxima contrátil para a noradrenalina reduzida na artéria pulmonar;
- g) integridade da musculatura vascular lisa e disfunção endotelial;
- h) aumento significativo da resposta contrátil da aorta para a noradrenalina, resultado até então inédito na literatura consultada.

Assim, os animais tratados com monocrotalina tornaram-se portadores de Hipertensão Arterial Pulmonar efetivando a implantação desse modelo experimental e das técnicas utilizadas para futuros estudos terapêuticos.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Aiello VD, et al. (1994) An immunohistochemical study of arterial lesions due to pulmonary hypertension in patients with congenital heart defects. **Cardiol Young.** 4:37-43.
2. Arribas S, Marín J, Ponte A, Balfagón G, Salaices M. (1994). Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertesion. **J Pharmacol and Experimental Therapeutics.**, 270: 520-527.
3. Arvola P, Wu X, Kahonen M, Makynen H, Riutta A, Mucha I, Solakivi T, Kainulainen H, Porsti I. (1999). Exercise enhance vasorelaxation in experimental obesity associated hypertension. **Cardiovasc Res.**, 43: 992-1002.
4. Bossone E, Butera G, Bodini BD, Rubenfire M. (2003) The interpretation of the electrocardiogram in patients with pulmonary hypertension: the need for clinical correlation. **Ital Heart J.** Dec;4(12):850-4.
5. Brodde O E & Michel M C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol Ver.**, 51 (4): 651-689.
6. Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C. (1998). Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 31: 108-115.
7. Bruner L H, Hilliker K S, Roth R. (1983). Pulmonary Hypertension and ECG changes from monocrotaline pyrrole in the rat. **Am J Physiol.**, H300-H306.
8. Buermans HP, Redout EM, Schiel AE, Musters RJ, Zuidwijk M, Eijk PP, van

- Hardeveld C, Kasanmoentalib S, Visser FC, Ylstra B, and Simonides WS. (2005). Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. **Physiol Genomics.**, 21: 314–323.
9. Buermans HP, Redout EM, Schiel AE, Musters RJ, Zuidwijk M, Eijk PP, van Hardeveld C, Kasanmoentalib S, Visser FC, Ylstra B, and Simonides WS. (2005). Microarray analysis reveals pivotal divergent mRNA expression profiles early in the development of either compensated ventricular hypertrophy or heart failure. **Physiol Genomics** 21: 314–323.
10. Chazova I, et al. Pulmonary artery adventitial changes and venous involvement in primary pulmonary hypertension. (1995). **Am J Pathol.**, 146:389-397.
11. Chen E P, akhter S A, Bittner H B, Koch W J, Davis R D, Trigt P V. (1999). Molecular and functional mechanisms of right ventricular adaptation in chronic pulmonary hypertension. **Ann Thorac Surg.**, 67: 1053-1058
12. Chen L, Gan X T, Haist J V, Feng Q, Lu X, Chakrabarti S, Karmazyn M. (2001). Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na-H Exchange inhibitor cariporide. **J Pharmacol and Experimental Therapeutics.** 298 (2): 469-476.
13. Chen S J, Chen Y F, Opgenorth, T J, Wessale J L, Meng Q C, Durand J, DiCarlo, V S, Oparil S. (1997). The orally active nonpeptide endothelin A-receptor antagonist A 127722 prevents and reverse hypoxia-induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in sprague-

- dawley rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 29(6): 713-725.
14. Cheeke P.R. (1994). A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pirrolizidine alkaloids. **Vet. Human Toxicol.** 36:240-247.
  15. Cheeke P.R. (1998). Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants. 2nd ed. **Interstate, Danville, Illinois.** 479p.
  16. Coats A J S, Adamapolos S, Radelli A, Mc Cance A, Meyer T E, Bernardi L, Solda P L, Davey P, Ormerod O, Forfar C, Conway J, Sleight P. (1992). Controlled trial os physical training in heart failure. **Circulation.**, 85: 2119-2131.
  17. Chu V, Otero JM, Lopes O, Morgan JP, Amende I and Hampton PG. (2001). Method non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. **BMC Physiology**, 1: 1-12.
  18. Costa ECS, Gonçalves AA, Áreas MA, Morgabel RGB. (2008). Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc de ratos riabéticos. **Arq Bras Cardiol** 90(4): 232-238.
  19. Colodel E.M., Traverso S.D, Seitz A.L., Oliveira F.N., Driemeier D. & Gava A. (2003). Spontaneous poisoning by *Dodonea viscosa* (Sapindaceae) in cattle. **Vet. Human Toxicol.** 45:47-148.
  20. Daí T, Tian Y, Tocchetti C G, Katori T, Murphy A M, Kass D A, Paolocci N, Gao W D. (2007). Nitroxyl increases force development in rat cardiac muscle. **J Physiol.**, 580: 951-960.
  21. Dhein S, Giessler C, Hoffmann I H, Leineweber K, Seypharth t, Brodde O E. (2002). Changes in  $\alpha$ -1 adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-

- treated rats. **Naun Sch Arch Pharmacol.**, 365: 87-95.
22. Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. (1998). Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. **Circulation.** Oct 6;98(14):1383-93.
  23. Favalaro, J L, Kemp-harper, B K. (2007). The nitroxyl anion (HNO) is a potent dilator of rat coronary vasculature. **Cardiovasc Res.**, 73:587-596.
  24. Favret F, Henderson K K, Allen J, Richalet J P, Gonzalez N C. (2001). Exercise training improves lung gas exchange and attenuates acute hypoxic pulmonary hypertension but does not prevent pulmonary hypertension of prolonged hypoxia. **J Appl Physiol.**, 100: 20-25.
  25. Folino AF, Bobbo F, Schiraldi C, Tona F, Romano S, Buja G, Bellotto F. (2003) Ventricular arrhythmias and autonomic profile in patients with primary pulmonary hypertension. **Lung.**, Nov-Dec;181(6):321-8
  26. Furchgott RF & Zawadzki JV. (1980). The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth by acetylcholine. **Nature.**, 288: 373-376.
  27. Goret I, Reboul C, Tanguy S, Dautzat M, Obert P. (2005). Training does not affect the alteration in pulmonary artery vasoreactivity in pulmonary hypertensives rats. **Eur J Pharmacol.**, 527: 121-128.
  28. Gout B, Quiniou M J, Khandoudi N, Dantec C L, Saiag B. (1999). Impaired endothelium-dependent relaxation by adrenomedullin in monocrotaline-treated rat arteries. **Eur J Pharmacol.**, 380: 23-30.
  29. Guimarães, JI. (2005) Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão

- Pulmonar – **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 1-182,.
30. Henkens IR, Mouchaers KT, Vliegen HW, van der Laarse WJ, Swenne CA, Maan AC, et al. (2007). Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 293:H1300-7.
  31. Henkens IR, Mouchaers KT, Vonk-Noordegraaf A, Boonstra A, Swenne CA, Maan AC, et al. (2008) Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular pressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging.. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 294:H2150-7.(A).
  32. Henkens IR, Scherptong, RWC, van Kralingen, KW, Said, SAM, Vliegen, H.W. (2008). Pulmonary hypertension: the role of the Electrocardiogram. **Neth Heart J**.16:250-4. (B).
  33. Hessel M H M, Steendijk P, Adel B d, Scutte C I, Laarse A v d. (2006). Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**., 291: H2424-H2430.
  34. Hoelz C, Negri EM, Lichtenfels AJ, Conceição GM, Barbas CS, Saldiva PH, Capelozzi VL. (2001). Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and secondary ARDS. A preliminary study in autopsies. **Pathol Res Pract**., 197(8):521-30
  35. Hongo M, Mawatari E, Sakay A, Ruan Z, Koizumi T, Terasawa F, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U, Shibamoto T. (2005). Effects of nicorandil on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **J Cardiovasc Pharmacol**., 46: 452-458.

36. Irvine J C, Favrolo J L, Widdop R E, Harper B K K. (2007). Nitroxyl anion donor, angeli's salt, does not develop tolerance in rat isolated aortae. **Hypertension.**, 49: 1-8.
37. Irvine J C, Favrolo J L, Harper B K K. (2003). NO-activates soluble guanylate cyclase and Kv channels to vasodilate resistance arteries. **Hypertension.**, 41: 1301-1307.
38. Ishikawa K, Hashimoto H, Mitani S, Toki Y, Okumura K, Ito T. (1995). Enalapril improves heart failure induced by monocrotaline without reducing pulmonary hypertension in rats: roles of preserved myocardial creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes. **Int J Cardiol.**, 47: 225-233.
39. Ito K M, Sato M, Ushijima K, Nakai M, Ito K. (2000) Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** ., 279: H1786-H1795.
40. Ivo R. Henkens,<sup>1</sup> Koen T. B. Mouchaers,<sup>2</sup> Anton Vonk-Noordegraaf,<sup>2</sup> Anco Boonstra,<sup>2</sup> Cees A. Swenne,<sup>1</sup> Arie C. Maan,<sup>1</sup> Sum-Che Man,<sup>1</sup> Jos W. R. Twisk,<sup>3</sup> Ernst E. van der Wall,<sup>1</sup> Martin J. Schalij,<sup>1</sup> and Hubert W. Vliegen<sup>1</sup>. (2008). Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular mpressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 294: H2150–H2157.
41. Kääb Galiè N, Rubin LJ, eds. Pulmonary arterial hypertension. Epidemiology, assessment, and therapy. (2004). **JACC.** 43(Suppl S):1S-90S.

42. Kanno S, Wu Y, Lee P C, Billiar T R, Ho C. (2001). Angiotensin-converting inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circulation.**, 104: 945-950.
43. Karam F.S.C., Soares M.P., Haraguchi M., Riet-Correa F., Mendez M.C. & Jarenkow J.A. (2004). Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** 24:191-1
44. Karliner JS, Sarnquist FF, Graber DJ, Peters RM Jr., West JB. (1985). The electrocardiogram at extreme altitude: experience on Mt. Everest. **Am Heart J.**,109:505-13.
45. Kiran T R, Subramanyam M V V, Devi S. (2004). Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. **Comparative Bioch and Physiol Part B.**, 137: 187-196.
46. Kim H.Y., Stermitz F.R., Wilson D.W., Taylor D. & Coulombe Jr R.A. (1993). Characterization of pyrrolizidine alkaloids-induced DNA-protein cross-link. **Carcinogenesis** 16:2691-2697.
47. Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen VP, Schott P, Brodde OE, and Hasenfuss G., (2003). Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. **Circ Res** 93: 230–237.
48. Kumar S, Kela AK, Mehta VL and Shukla AK (1995). Preferred anaesthetic agents in experimental cardiology: a study on rat electrocardiogram. **Ind. J. Pharmacol.** 23: 127-129.

49. Ku D. D., Wu H. C., Sun X., (2005). Garlic prevent monocrotaline pulmonary hypertension and preserves pulmonary endothelial function in rats. **FASEB J.**, abstract 88.1.
50. Lamberts R R, Vaessen R J, Westerhof N, Stienen G J M., (2007)., Right ventricular hypertrophy causes impairment of left ventricular diastolic function in the rat. **Basic Res Cardiol.**, 102: 19-27.
51. Leineweber K, Seyfarth T, Brodde O E., (2000). Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake<sub>1</sub>) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. **British J Pharmacol.**, 131: 1438-1444.
52. Leineweber K, Seyfarth T, Abraham G, Gerbershagen HP, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde OE., (2003). Cardiac beta-adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. **J Cardiovasc Pharmacol.** Mar;41(3):333-42.
53. Lekanne-Deprez RH, van den Hoff MJ, de Boer PA, Ruijter PM, Maas AA, Chamuleau RA, Lamers WH, and Moorman AF., (1998). Changing patterns of gene expression in the pulmonary trunk-banded rat heart. **J Mol Cell Cardiol.**, 30: 1877–1888.
54. Lopes A A. (2005). Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Pulmonar. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia.**
55. Lourenço A P, Albuquerque R R, Silva C B, Faria B, Wieland J, Coelho T H, Pinto J C, Moreira A F L., (2006). Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling em left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Am J Physiol Heart**

- Circ Physiol.**, 291: 1587-1594.
56. Luz P L, Laurindo F R M e Chagas A C P. *Endotélio: doenças cardiovasculares*. (2003).
57. Marleen H. M. Hessel, Paul Steendijk, Brigit den Adel, Cindy I. Schutte, and Arnoud van der Laarse. (2006). Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 291: H2424–H2430.
58. Maruyama, H; Watanabe, S; Kimura, T; Liang, J; Nagasawa, T, Onodera, M Kazutaka. (2007). Granulocyte Colony-Stimulating Factor Prevents Progression of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. **Circ J**; 71: 138 –143.
59. Mattocks A.R. (1986). Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. **Academic Press**, London. 393p.
60. Ma X L, Gao F, Liu G L, Lopez B L, Christopher T A, Fukuto J M, Wink D A, Feelisch M. (1999). Opposite effects of nitric oxide and nitroxyl on postischemic myocardial injury. **Pharmacol.**, 96: 14617-14622.
61. Mawatari E, Hongo M, Sakai A, Terasawa F, Takahashi M, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U. (2007). Amlodipine prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats independent of blood pressure lowering. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. Jul;34(7):594-600.
62. McLaughlin V V & McGoon M D. (2006). Pulmonary arterial hypertension. **Circulation.**, 114: 1417-1431.

63. McGoon M, Gutterman D, Steen V, Barst R, McCrory DC, Fortin TA, et al. (2004). Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**;126:14S-34S.
64. Mereles D, Ehlken n, Kreuzer S, Ghofani S, Hoeper M M. (2006). Exercise and respiratory improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. **Circulation.**, 114: 1482-1489.
65. Micheli A, Aranda A, Medrano GA. (2006). Electrocardiographic features of right ventricular hypertrophy in chronic cor pulmonale. **Arch Cardiol Mex.**, Jan-Mar;76(1):69-74
66. Mingatto FE, Dorta DJ, dos Santos AB, Carvalho I, da Silva CH, da Silva VB, Uyemura SA, dos Santos AC, Curti C. (2007). Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol.**, Oct;50(5):724-30. Epub 2007 Jun 26.
67. Mingatto FE, Maioli MA, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL. (2008). Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver. **Toxicol Lett.** Sep 16.
68. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yanu M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K. (1993). Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocotaine-induced pulmonary hypertension. **Circ Res.**, 73: 887-897.
69. Morita K M D, Ogawa Y M D, Tobise K M D. (1996). Effect of endothelium of pulmonary artery vasoreactivity in monocrotaline-induced pulmonary

- hypertensive rats. **Jpn Circ J.**, 60: 585-592.
70. Newby AC, Zalstman AB. (2000). Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. **J Pathol.**, 190:300-309.
71. Newman J H, Robbins I M. (2006). Exercise training in pulmonary hypertension: implications for the evaluation of drugs trial. **Circulation.**, 114:1448-1449.
72. Oriowo M A, Chandrasekhar B, Kadavil E. (2003),  $\alpha$  1 adrenoceptor subtypes mediating noradrenaline-induced contraction of pulmonary hypertensives rats. **Eur J Pharmacol.**, 482: 255-263.
73. Paolocci N, Saavedra W F, Miranda K M, Martigani C, Isoda T, Hare J M, Espey M G, Fukuto J M, Feelish M, Wink D A, Kass D A. (2001). Nitroxyl anion redox-sensitive positive cardiac inotropy in vivo by calcitonin gene-related peptide signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 28; 98 (18): 10463-8.
74. Paolocci N, Katori T, Champion H C, Jhon A E St, Miranda K M, Fukuto J M, Wink D A, Kass D A. (2003). Positive inotropic effects of HNO/NO<sup>-</sup> in failing hearts: independence from  $\beta$ -adrenergic signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 29; 100 (9): 5537-42.
75. Pelá G, Missale C, Raddino R, Condorelli E, Spano P F, Visioli O J. (1990).  $\beta$ - 1 and  $\beta$ -2 Receptors are differentially desensitized in an experimental model of heart failure. **Cardiovasc Pharmacol.**, 839-846.
76. Post J M, Hume J R, Archer S L, Weir K. (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Cell physiol.**, 31: C882 – 890.

77. Rabinovitch M. (2001). Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. **Clin Chest Med.**, 22:433-449.
78. Rabinovitch M. (1999). Pulmonary hypertension: pathophysiology as a basis for clinical decision making. **J Heart Lung Transpl.**, 18:1041-1052.
79. Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. (2002). Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.347-360.
80. Rosenberg H. C. e Rabinovitch M. (1988). Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 255: H1484 – H1491.
81. Said, Sami I. (2006). Mediators em modulators of pulmonary hypertension. **Am J Physiol Cell Mol Physiol.**, 291: L547-L558.
82. Santos JCA, Riet-Correa<sup>3</sup> F, S, Simões<sup>3</sup> SVD, e Barros SL. (2008). Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 28(1):1-14, janeiro.
83. Sanyal S N, Ono K. (2002). Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. **Patophysiology.**, 8: 197-203.
84. Schott P, Singer SS, Kogler H, Neddermeier D, Leineweber K, Brodde OE, Regitz-Zagrosek V, Schmidt B, Dihazi H, and Hasenfuss G. (2005). Pressure overload and neurohumoral activation differentially affect the myocardial proteome. **Proteomics.**, 5: 1372–1381.
85. Seawright A.A., Lee J.S., Allen J.G. & Hrdlicka J. (1978). Toxicity of *Myoporum* spp. and their furanosequiterpenoid essential oils, p.241- 250.

- In: Keeler R.F., Van Kampen K.R. & James L.F. (ed.), **Effects of Poisonous Plants on Livestock**. Academic Press, New York.
86. Seyfarth T, Gerbershagen H P, Giessler C, Leineweber K, Hoffmann I H, Ponicke K, Brodde O E. (2000). The cardiac  $\beta$  adrenoceptor- G-protein(s)-adenylyl cyclase system in monocrotaline-treated rats. **J Mol Cell Cardiol.**, 32: 2315-2326.
87. Schermuly R T, Kreisselmeier K P, Ghofrani H A, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrat D, Seeger W, Grimminger F. (2004). Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Am J Respir Crit Care Med.**, 169:39-45.
88. Schneider D A, Mc Lellan T M, Gass GC. (2000). Plasma catecholamine and blood lactate responses to incremental arm and leg exercise. **Med Sci Sports Exerc.**, 32: 608-613.
89. Shubat P J, Bowers R J and Huxtable R J. (1989). Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - Adenosine Triphosphatase activity of pulmonary arteries after intoxication with the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. **J Pharmacol Exp Ther.**, 252: 70-76
90. Satoh F, Fujita MQ, Seto Y, Tsuboi A, Takeichi S. (2004). Sudden death in a patient with idiopathic scoliosis. **Eur J Heart Fail.**, Mar 1;6(2):181-5
91. Sperl W., Stuppner H., Gassner I., Judmaier W., Dietze O. & Vogel W. (1995). Reversible hepatic veno-occlusive disease in na infant after consumption of pirrolizidine-containing herbal tea. **Eur. J. Pediatr.** 154:112-116.
92. Spinale FG, Gunasinghe H, Sprunger PD, Baskin JM, and Bradham WC.

- (2002). Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failure. **J Card Fail** 8., S332–S338.
93. Steinber G, Susan F. (2002).  $\alpha$  1-adrenergic receptor subtype function in cardiomyocytes: lessons from genetic models in mice. **J Mol Cell Cardiol.**, 34: 1141-1145.
94. Stenmark KR, et al. (1987). Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4300 m. **J Appl Physiol.**, 62:821-830.
95. Sun X e Ku D.D. (2005). Selective right, but not left, coronary endothelial dysfunction precedes development of pulmonary hypertension and right heart hypertrophy in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 290: H758 – H764.
96. Tagaya E, Tamaoki J, Kawatani K, Nagai <sup>a</sup>. (2001). Role of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in sodium-nitroprusside – induced relaxation of pulmonary artery under hypoxia. **Respiration.**, 68: 186-191.
97. Taylor D W, Wilson D W, Lamé M W, Dunston S D, Jones A D, Segall H J. (1997). Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 143: 196-204.
98. Thomas H C, Lamé M W, Dunston S K, Segall H J, Wilson D W. (1998). Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 151: 236-244.
99. Tocchetti C G, Wang W, Froehlich J P, Huke S, Aon M A, Wilsol G M, Benedetto G D, O'Rourke B, Gao W D, Wink D A, Toscano J P, Zaccolo M,

- Bers D M, Valdivia H H, Cheng H, Kass D A, Paolucci N. (2007). Nitroxyl improves cellular heart function by-directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling. **Circ Res.**, 100: 0-0.
100. Toma I, Kang J J, Sipos A, Vargas S, Bansal E, Hanner F, Meer E, Peti-Peterdi J. (2008). Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. **J Clin Invest.**; July 1; 118(7): 2526–2534.
101. Tudor RM et al. (2001) The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. **Clin Chest Med.**, 22:405-418.
102. Tudor RM, et al. (1994). Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present. in plexiform lesions of pulmonary hypertension. **Am J Pathol.**, 144:275-285.
103. Usui S, Yao A, Hatano M, Kohmoto O, Takahashi T, Nagai R, Kinugawa K. (2006). Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. **Circ J.** Sep;70(9):1208-15.
104. Uchino T, Shamarendra N, Sanyal NS, YAMABE M, KAKUI T, Takebayashi S, Shimaoka T, Shimada T, Noguchi T, and ONO, K. (2008). Rescue of Pulmonary Hypertension with an Oral Sulfonamide Antibiotic Sulfoxazole by Endothelin Receptor Antagonistic Actions. **Hypertens Res.** Vol. 31, No. 9.
105. Vaananen A J, Salmenpera P, Hukkanen M, Miranda K M, Harjula A, Rauhala P, Kankuri E. (2008). Persistent susceptibility of cathepsin B to irreversible inhibition by nitroxyl (HNO) in the presence of endogenous nitric

- oxide. **Free Radical Biology e Medicine.**, xx: xxx – xxx.
106. Van der Laarse A. (2002). Hypothesis: troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. **Cardiovasc Res** 56: 8–14.
107. Velez-roa S, Ciarka A, Najem B, Vachierey J L, Naeiji R, Borne P V. (2004). Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. **Circulation.**, 110: 1308-1312.
108. Verzola, R M M, Mesquita R A, Peviane S, Ramos O H P, Moriscot A S, Perez S E A, Araújo H S S. (2006). Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. **Braz J Med Biol Res.**, 39(35): 621-627.
109. Xiaowei Sun and David D. Ku. (2008). Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 294: H801–H809.
110. Xiaohong CL, Gan T, Haist JV, Feng Q, Lu X, Chakrabarti S, and Karmazyn M. (2001). Attenuation of compensatory right centricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide. **Journal Physiol. Eexp. Ther.** 298:469–476.
111. Wanstall J C, Jeffery T K, Gambino A, Lovren F, Triggle C R. (2001). Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparason with acetyloline, nitric oxide and nitroxil ion. **British J Pharmacol.**, 134: 463-472.

112. Webster R, Ely P B. (2002). Treinamento em microcirurgia vascular: é economicamente viável?. **Acta Cir Bras.**, 17: 194-197.
113. Werchan P M, Summer W R, Gerdes A M, McDonough K H. (1989). Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Heart Circ Physiol.**, 25: H1328-H1336.
114. Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, and McDonough KH. (1989). Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 256: H1328–H1336.
115. Yan CC, Huxtable RJ. (1995). Relationship between glutathione concentration and metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, in the isolated, perfused liver. **Toxicol Appl Pharmacol.**, Jan;130(1):132-9.
116. Zanichelli P G, Estrela H F G, Spadari-Bratfisch R C, Grassi-Kassisse D M, Franco D W. (2007). The effects of ruthenium tetraammine compounds on vascular smooth muscle. **Nitric oxide.**, 6: 189-196.
117. Zanichelli P G, Miotto A M, Estrela H F G, Soares F R, Grassi-Kassisse D M, Spadari-Bratfisch R C, Castellano E E, Roncaroli F, Parise A R, Olabe J A, de Brito A R, Franco D W. (2004). The [Ru(Hedta)Na] (0.1) System: structure chemical reactivity and biological assays. **J. Inorg. Biochem.**, 98: 1921-1932.



## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de Mestrado/Doutorado intitulada “ *Implantação do modelo de Hipertensão Arterial Pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. Avaliação Eletrocardiográfica.* ”

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_;

( X ) tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº 1650-2);

( ) tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº \_\_\_\_\_);

( ) tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.  
Especificar: \_\_\_\_\_

  
Aluno: Fernanda Pencheiro Henrique Cabrini

  
Orientador: Prof. Dr Miguel Arcaño Areas

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

( X ) Deferido ( ) Indeferido

  
Nome: \_\_\_\_\_  
Função: \_\_\_\_\_  
Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEAI/IB - UNICAMP