UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Mônica Tanaka Paganotti

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CARDIORESPIRATÓRIAS EM RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Vitória 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Mônica Tanaka Paganotti

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CARDIORESPIRATÓRIAS EM RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

ORIENTADOR

Prof. Dr. Helder Mauad

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas

Vitória - 2006

Paganotti, Mônica Tanaka Estudo das alterações cardiorespiratórias em ratos com Hipertensão Pulmonar induzida por Monocrotalina / Mônica Tanaka Paganotti – Vitória, 2006. 131 p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – CCS – Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Helder Mauad

- 1. Hipertensão Pulmonar
- 2. Reflexos Cardiovasculares
- 3. Monocrotalina
- I. Titulo

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CÁRDIORESPIRATÓRIAS EM RATOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Mônica Tanaka Paganotti

Dissertação de Mestrado aprovada pela Comissão Examinadora formada pelos Professores:

Orientador:

Prof. Dr. Helder Mauad Departamento de Ciências Fisiológicas – CCS – UFES Profa. Dra. Gláucia Rodrigues de Abreu Departamento de Ciências Fisiológicas – CCS – UFES

Profa. Dra. Ana Maria Casati N. da Gama Departamento de Clínica Médica - CCS– HUCAM – UFES

Coordenador do PPGCF: Prof. Dr. José Geraldo Mill Departamento de Ciências Fisiológicas – CCS - UFES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA, FEVEREIRO DE 2006

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, e sem o qual nenhuma ciência tem valor;

À minha mãe, presença constante em todos os momentos de minha vida, fonte de calma, serenidade e equilíbrio, onde sempre me apoiei e me inspirei;

Ao meu pai, pelo apoio incondicional em meus estudos e crescimento pessoal e profissional, pelo zelo e cuidado com meu futuro, me incentivando e animando com palavras revigorantes e sábias;

Às minhas queridas irmãs, Milaine e Lara, pelo incentivo, presença, e companheirismo (não sei o que seria de mim sem vocês!);

Ao meu esposo Maurício, pelo amor, compreensão, auxílio, por caminhar ao meu lado. Amo você! ;

À minha amada filha Luiza, por seu sorriso reconfortante e seu abraço tão acolhedor, trazendo paz e alegria todos os dias de minha vida;

Ao Prof. Dr. Helder Mauad, o meu mais profundo agradecimento, pelo auxílio em todos os âmbitos científicos, pela paciência e tranqüilidade na condução de toda a pesquisa;

Ao Prof. Dr. Paulo Merçon Vargas (Departamento de Patologia – UFES) pelo auxílio na confecção e análise das lâminas histológicas, e ao Prof. Dr. Carlos Alberto Redins (Departamento de Morfologia – UFES) pela disponibilidade e pelo auxílio no manejo do microscópio;

Às amigas Eunice e Mariângela, pelo exemplo de conduta na profissão de Fisioterapeuta, e principalmente, pela certeza de uma amizade eterna e verdadeira, com a qual tenho o grande prazer de contar;

Aos colegas / professores da EMESCAM, e a todos os professores do Programa de Pós-graduação da UFES;

Aos colegas de laboratório Élio, Rodrigo, Tuula, Diego, Fabian, Ana Raquel, pela convivência tão agradável, e pelos bons momentos que passamos juntos;

Aos colegas do programa de pós-graduação Débora, Juliana, Aurélia, Geysa, Daniele, Ágata, Wagner, Valquíria, Enildo, Alessandra, Josiane e tantos outros que compuseram essa história junto comigo;

Ao Edson, pela disponibilidade e pelo auxílio certo nas tantas vezes em que o solicitei;

Aos funcionários do biotério, pela presteza na aquisição de animais.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- △FC Variação da freqüência cardíaca
- △PAM Variação da pressão arterial média
- B-J Reflexo Bezold-Jarisch
- bpm Batimentos por minuto
- cpm Ciclos por minuto
- dP/dT Derivada de pressão sobre tempo
- ET-1 Endotelina-1
- FBG Fenilbiguanida
- FC Freqüência cardíaca
- FR Freqüência respiratória
- HCO_3^{-} Íon Bicarbonato
- HP Hipertensão Pulmonar

- ICD Insuficiência cardíaca direita
- KCN Cianeto de potássio
- MCT Monocrotalina
- mmHg Milímetros de mercúrio
- NO Óxido nítrico
- PA Pressão arterial
- PaCO₂ Pressão arterial de dióxido de carbono
- PAM Pressão arterial média
- PaO₂ Pressão arterial de oxigênio
- PDI Pressão diastólica inicial
- PDF Pressão diastólica final
- pH Potencial hidrogeniônico
- PSV Pressão sistólica ventricular
- Sat Hb Saturação de hemoglobina
- SNC Sistema Nervoso Central
- TM/R Espessura da camada média arteriolar

- VC Volume-corrente
- VD Ventrículo direito
- VE Ventrículo esquerdo
- Vmin Volume-minuto
- TM/R Espessura da camada média arteriolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Câmara pletismográfica

- Figura 2 Curva sigmoidal barorreflexa
- Figura 3 Variação de peso corporal dos animais ao início, na 1ª, 2ª e na 3ª semana após injeção de monocrotalina ou salina.

Figura 4 – Valores basais de PAM (A) e FC (B) média dos grupos salina e monocrotalina.

Figura 5 – Valores de Volume Corrente (VC) (A), Freqüência Respiratória (FR) (B) e de Volume-minuto (Vmin) (C) corrigidos pelo peso corporal.

Figura 6 – Valores gasométricos da Pressão arterial de Oxigênio (PaO₂) (A) e de saturação de hemoglobina (SatHb) (B).

Figura 7 – Valores gasométricos do potencial hidrogênico (pH) (A), da pressão arterial de dióxido de carbônio (PaCO₂) e do bicarbonato (HCO₃⁻).

Figura 8 – Barocurvas (A) e a primeira derivada logística da função sigmoidal (ganho máximo) (B) de animais do grupo salina e monocrotalina.

Figura 9 - Reflexo de Bezold-Jarisch - Variação de FC (Δ FC) (A) e variação de PAM (Δ PAM) (B) à estimulação de FBG nas doses de 1,5; 3; 6; 12 e 24 µg/kg em ratos do grupo salina e MCT.

Figura 10 – Quimiorreflexo – Variação de freqüência cardíaca (Δ FC) (A) e variação de pressão arterial média (Δ PAM) (B) nos grupos salina e monocrotalina.

Figura 11 – Alterações de frequência cardíaca (FC), após bloqueio com atenolol e metil-atropina.

Figura 12 – Valores de peso úmido e seco (corrigido por peso corporal) de ventrículo direito (A) e de ventrículo esquerdo (B).

Figura 13 – Valores de peso úmido e seco (corrigido por peso corporal) dos pulmões (A) e fígado (B).

Figura 14 - Distribuição do número de arteríolas pulmonares de acordo com o raio, nos ratos dos grupos salina e monocrotalina.

Figura 15 - Análise de correlação entre a relação TM/R e o raio das arteríolas pulmonares dos ratos dos grupos salina e monocrotalina.

Figura 16 - Distribuição da espessura da média (TM/R) das arteríolas pulmonares nos ratos dos grupos salina e monocrotalina.

Figura 17 – Micrografia representativa de uma secção transversal típica de uma artéria pulmonar de um animal do grupo salina, mostrando as lâminas elástica interna e externa.

Figura 18 – Micrografia representativa de uma secção transversal típica de uma artéria pulmonar de um animal do grupo monocrotalina, mostrando hipertrofia acentuada da camada média com obliteração parcial do lúmen.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES	V
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	13
MATERIAL E MÉTODOS	15
1.0 – Local	16
2.0 – Animais experimentais	16
3.0 – Anestesia	16
4.0 – Tratamento dos animais para indução da hipertensão pulmonar	16
5.0 - Cateterização da veia e artéria femoral	17
6.0 – Registro direto da pressão arterial e da freqüência cardíaca	18
7.0 – Registro Pletismográfico de corpo inteiro	18

8.0 – Cálculos dos parâmetros ventilatórios	20
8.1 – Fator de correção	21
8.2 – Outras variáveis ventilatórias calculadas	21
9.0 - Avaliação Gasométrica	22
10.0 - Avaliação das pressões ventriculares	22
11.0 – Avaliação dos reflexos cardiovasculares	23
11.1 – Estimulação do Baroreflexo	23
11.2 – Estimulação do Reflexo Bezold-Jarisch	25
11.3 – Estimulação dos quimiorreceptores periféricos carotídeos	26
12.0 – Avaliação dos componentes autonômicos	26
13.0 – Determinação dos pesos seco e úmido das câmaras cardíacas,	
pulmão e fígado	26
14.0 – Histologia pulmonar	27
14.1 – Métodos anátomo-patológicos	27
15.0 – Drogas e substâncias utilizadas	30
16.0 – Análise estatística	31

17.0 – Protocolos experimentais	31
17.1 – Avaliação cardiovascular, respiratória e gasométrica	31
17.2 – Avaliação das pressões ventriculares	32
17.3 – Avaliação dos Reflexos Cardiovasculares	32
17.3.1 – Avaliação do Barorreflexo	32
17.3.2 – Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch	32
17.3.3 - Avaliação do Quimiorreflexo	33
17.4 – Bloqueio autonômico	33
17.5 – Histologia Pulmonar	34
RESULTADOS	35
1.0 - Peso corporal	36
2.0 - Valores basais de pressão arterial média (PAM) e freqüência	
cardíaca (FC)	37
3.0 - Registros Ventilatórios	38
4.0 - Gasometria	38
5.0 - Pressões Ventriculares	42

5.1. Pressão de ventrículo direito (VD)	42
5.2. Pressão de ventrículo esquerdo (VE)	42
6.0 - Reflexos Cardiovasculares	45
6.1. Avaliação do Barorreflexo em ratos submetidos à hipertensão	
pulmonar induzida por monocrotalina	45
6.2. Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch (B-J) em ratos submetidos à	
hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina	48
6.3. Avaliação do Quimiorreflexo em ratos submetidos à hipertensão	
pulmonar induzida por monocrotalina	50
7.0 - Avaliação autonômica	52
8.0 - Peso úmido e seco de coração, pulmão e fígado	54
9.0 - Histologia Pulmonar	57
DISCUSSÃO	62
1.0 - Alterações Anátomo-Patológicas da Vasculatura Pulmonar	64
2.0 - Avaliação do Peso Corporal	67
3.0 - Avaliações Hemodinâmicas	67

4.0 - Registros Respiratórios	71
5.0 - Gasometria	75
6.0 – Pressões ventriculares	76
7.0 - Reflexos cardiovasculares	77
7.1 – Avaliação do barorreflexo em ratos submetidos à hipertensão	
pulmonar experimental	77
7.2 - Avaliação do reflexo Bezold-Jarisch em ratos submetidos à	
hipertensão pulmonar experimental	80
7.3 - Avaliação do quimiorreflexo em ratos submetidos à hipertrofia	
pulmonar experimental	84
8.0 - Avaliação autonômica	86
9.0 - Peso úmido e seco de coração, pulmão e fígado	88
9.1 – Peso de câmaras cardíacas	88
9.2 - Peso de pulmões	88
9.3 – Peso de fígado	89
CONCLUSÃO	91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	113
APÊNDICES	117

RESUMO

A Hipertensão Pulmonar (HP) induzida por monocrotalina (MCT) constitui um quadro fisiopatológico que envolve várias alterações cardiovasculares e respiratórias importantes. Apesar dos vários estudos já realizados estas alterações permanecem por serem mais bem caracterizadas, assim como terem seus mecanismos de ação evidenciados. Os objetivos deste estudo foram avaliar as alterações hemodinâmicas e cardiovasculares reflexas de ratos tratados com MCT, bem como as alterações respiratórias e gasométricas destes animais. Para tanto, ratos *Wistar* (220-240 g.) receberam uma injeção subcutânea única de MCT (60 mg/kg) ou o mesmo volume de salina. Após três semanas, foram feitos os registros cardiovasculares, respiratórios, gasométricos e histologia pulmonar. Os resultados mostraram aumento significante na FC média basal dos ratos tratados com MCT, sem alteração nos níveis basais de PAM. Além disso, estes animais apresentaram um aumento significante na freqüência respiratória (FR), volume corrente (VC) e volume-minuto (Vmin). Uma diminuição da pressão parcial de oxigênio (PaO₂) e da saturação de hemoglobina (Sat Hb) também foi observada nestes animais. Uma importante hipertrofia de VD foi observada no

grupo MCT. Em relação aos reflexos cardiovasculares observamos uma atenuação do ganho barorreflexo e uma redução das respostas pressora e bradicárdica quimiorreflexas no grupo MCT, além de uma exacerbação da resposta bradicárdica do reflexo de Bezold-Jarisch. A avaliação do componente autonômico demonstrou um aumento na atividade simpática no grupo MCT e uma redução da atividade parassimpática. As análises anatomo-patológicas revelaram um espessamento da camada média das artérias e arteríolas pulmonares no grupo MCT. Estes resultados nos permitem concluir que o tratamento com MCT induz a um quadro de HP caracterizado por alterações hemodinâmicas e cardiovasculares reflexas, além de alterações respiratórias. A disfunção autonômica encontrada nesse estudo, caracterizada por atividade simpática aumentada com atenuação da atividade parassimpática, tem importante contexto clínico, uma vez que tais achados contribuem como fator de risco aumentado para infarto cardíaco ou morte súbita.

Palavras chave: hipertensão pulmonar; monocrotalina; reflexos cardiovasculares.

ABSTRACT

Pulmonary Hypertension (PH) monocrotaline (MCT)-induced constitutes an important patho-physiological state involving several cardiovascular and respiratory changes. Despite of many studies performed, some aspects remain to be elucidated, as well as, theirs mechanisms. The aims of this study were to evaluate the hemodynamics and cardiovascular reflexes changes in rats treated with MCT, as well as the respiratory and gasometrical changes in these animals. In order, male Wistar rats (220-240 g.) received a single subcutaneous injection of MCT (60 mg/kg) or same saline volume. After three weeks, cardiovascular and respiratory recordings and gasometrical and pulmonary histology were performed. Our results showed a significant increase in the basal mean heart rate (HR) in rats treated with MCT, without changes in the basal levels of mean arterial pressure (MAP). Moreover, these animals showed a significant increase in respiratory frequency (RF), tidal volume (V_T) and in the volume-minute ventilation (Vmin). Reduction in the oxygen partial pressure (PaO₂) and the hemoglobin saturation were also observed. An important hypertrophy of RV was found in the MCT group. In relation to cardiovascular reflexes, we observed attenuation of the baroreflex gain and in the pressure and bradicardic responses of the chemoreflex in MCT group, besides an exacerbation of the bradicardic response of the Bezold-Jarisch reflex. The evaluation of the autonomic component showed an increase in the sympathetic activity in the MCT group and a reduction of the parasympathetic activity. Anatomo-pathological analyses revealed an increase of the thickness of the medial layer of the pulmonary artery and arterioles in MCT group. These results allow us to conclude that treatment with MCT induced a PH state characterized by hemodynamic and cardiovascular reflexes changes, besides of the respiratory adjustments. The

autonomic dysfunction found in this study, characterized by an increase of the sympathetic and attenuation of the parasympathetic activities plays an important clinical significance, considering that these findings contribute as a risk factor increased for cardiac infarction or sudden death.

Keywords: pulmonary hypertension, monocrotaline, cardiovascular reflexes.

INTRODUÇÃO

A Hipertensão Pulmonar (HP) é uma complicação comum das doenças cardiopulmonares. É definida como aumento na pressão arterial média pulmonar acima de 25 mmHg em repouso, ou >30 mmHg ao exercício (Rich et al., 1999). Apesar da etiologia diversificada, todos os pacientes com HP crônica apresentam mudanças estruturais na vasculatura pulmonar, caracterizada por destruição e estreitamento progressivo dos vasos sanguíneos pulmonares, hipertrofia ventricular direita, e em longo prazo, falência ventricular direita (D'Alonzo et al., 1991; Klinger e Hill, 1991). Nas fases mais avançados da doença, o aumento da pressão na artéria pulmonar provoca uma sobrecarga de trabalho para o coração que pode conduzir a insuficiência cardíaca (Newman et al., 2004). A simples presença de HP, na vigência de qualquer cardiopatia ou pneumopatia, está associada a um prognóstico pior e aumenta o risco de eventuais intervenções terapêuticas (Peacock, 2003).

A HP ocorre mais em mulheres que homens (2:1), têm uma idade média no diagnóstico aos 36 anos, e é usualmente fatal em 3 anos se não tratada. Entretanto, tratamentos modernos têm melhorado acentuadamente a função física e aumentado a sobrevivência dos pacientes (Newman et al., 2004).

Até 1998, a doença era classificada em dois grupos: Hipertensão Pulmonar Primária, quando não se conhecem as causas subjacentes à doença; e Hipertensão Pulmonar Secundária, quando se conhece pelo menos uma causa para a ocorrência da doença. Em 1998, a Organização Mundial de

Saúde (OMS) criou um sistema uniforme para definir os diferentes tipos de HP, tendo estabelecido cinco grupos principais, baseados em critérios fisiopatológicos (ANEXO I), a saber: HP arterial, HP venosa, HP associada com distúrbios respiratórios e/ou hipoxemia, HP resultante de doença trombótica e/ou embólica crônica, e HP resultante de desordens que afetam diretamente a vasculatura pulmonar (Rubin et al., 2004). Os pacientes com HP podem também ser classificados de acordo com a habilidade em desenvolver suas atividades (ANEXO II) (Nauser e Stites, 2001).

O endotélio tem um importante papel na fisiopatogenia da HP, uma vez que, quando lesado, exibe uma pronunciada tendência à vasoconstrição e trombose, com aumento da produção de fatores pró-coagulantes e diminuição de substâncias anticoagulantes (Larumbe e Escoboza, 1994); uma maior expressão local de citocinas envolvidas na regulação da proliferação muscular lisa e produção de matriz extracelular (Lopez-Bárneo et al., 1993); um aumento da adesividade do endotélio devido ao aumento de moléculas de adesão e secreção de substâncias vasoconstritoras, com consequente aumento do tônus vascular, além da diminuição da produção de prostaciclina e de fator relaxante derivado do endotélio. O resultado seria um aumento da pressão arterial pulmonar, o que, devido ao aumento das forças de estresse sobre a parede vascular, serviria também para provocar maior dano ao endotélio, juntamente com outros fatores associados, tais como acidose e aumento de radicais livres (Loscalzo, 1992). Além disso, a destruição de um grande número de arteríolas pulmonares, evidenciado na HP, reduz a área de secção transversal do leito vascular pulmonar, produzindo assim um aumento permanente da resistência vascular pulmonar, e uma hipertensão pulmonar definitiva (Rich, 1999). Outros mecanismos ligados à gênese da doença incluem: alterações do tônus vascular pulmonar com vasoconstrição pulmonar por hipóxia; proliferação celular e alteração da matriz com remodelamento vascular pulmonar; ativação plaquetária com expressões aumentadas de serotoninas livres circulantes; condições inflamatórias e mutações genéticas (Barreto et al., 2005).

Em vista dos mecanismos descritos, fica claro que a HP é uma síndrome cujo início e progressão se processa de maneira diversa, uma vez que não é possível imaginar o mesmo mecanismo para explicar a vasoconstrição e o remodelamento vascular em todas as formas de HP. Além disso, mesmo se considerarmos uma única forma da doença, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos podem variar de acordo com a fase evolutiva (Rubin et al., 2004).

Considerando os achados clínicos da HP, um dado importante se refere ao aumento da pressão sistólica do ventrículo direito (VD), hipertrofia e dilatação ventricular direita, com progressiva redução do rendimento cardíaco. A demanda miocárdica de oxigênio para o ventrículo direito também se

apresenta aumentada nessa condição, com diminuição do fluxo sistólico à artéria coronária direita devido às elevações na pressão do VD (Weitzenblum et al., 1983). Embora o ventrículo esquerdo não seja diretamente comprometido, a progressiva dilatação do VD pode prejudicar seu desempenho devido a interações com o septo interventricular (Louie et al., 1995; Nootens et al., 1995).

Com relação às alterações vasculares pulmonares encontradas na HP, a diminuição da saturação arterial de oxigênio pode ser encontrada, bem como policitemia. Outros achados incluem hipoxemia leve a moderada (média de PaO₂ = 72±16 mmHg) e a radiografia torácica pode mostrar um aumento da artéria pulmonar principal e seus ramos principais, com afilamento acentuado das artérias periféricas. Em alguns pacientes, a realização de espirometria pode denotar volumes residuais aumentados e ventilação voluntária máxima reduzida (Rich, 1995).

Vários investigadores têm procurado estudar os mecanismos fisiopatológicos da HP. Temos observado que a maioria destes estudos é realizada em humanos, embora existam vários modelos experimentais para indução da HP. Estes estudos experimentais, por sua vez, mostram principalmente as alterações morfofuncionais da HP a despeito de uma adequada avaliação dos mecanismos funcionais que possivelmente estão alterados em relação aos sistemas cardiovascular e respiratório. Desta forma, um dos objetivos deste estudo foi caracterizar estas alterações funcionais em um modelo experimental, a fim de que os mecanismos fisiológicos envolvidos possam ser evidenciados, uma vez que alguns dos parâmetros relatados nos estudos em humanos não necessariamente se aplicam ao animal experimental, como por exemplo, as manobras de esforço respiratório.

Modelos experimentais para indução de doenças cardiopulmonares tem sido extensivamente relatados na literatura científica, fornecendo informações úteis referentes ao entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que irão tipificar as diversas doenças. Os modelos de doenças pulmonares mais investigados incluem: bronquite, por inalação de agentes poluentes, fumaça de cigarro, dióxido sulfúrico ou endotoxinas (Nikula e Green, 2000); asma / alergia, por exposição a gases nocivos como dióxido sulfúrico (Drazen et al., 1999); doença pulmonar obstrutiva crônica, por instilação de elastase, inalação de agentes nocivos ou modelos geneticamente modificados (Fehrenbach, 2003); enfisema pulmonar, através de instilação intra-traqueal de papaína (March

et al., 2000), ou por injeção intravenosa de tripsina (Reichart et al., 1992) e fibrose intersticial e infecções pulmonares (Fehrenbach, 2003). Esses estudos provêem uma referência importante para a seleção de modelos animais apropriados de doenças cardiopulmonares, e identifica não somente suas similaridades fisiopatológicas e/ou diferenças em humanos, mas também sua utilidade potencial nos estudos de investigação de condutas terapêuticas.

Considerando-se o elevado índice de mortalidade em pacientes com hipertensão pulmonar, modelos experimentais que resultem em alterações, tanto morfo-histológicas como fisiológicas destes pulmões, mimetizando as alterações encontradas neste tipo de paciente, revestem-se de extrema importância.

Os principais modelos experimentais de estudo que induzem a um quadro de Hipertensão Pulmonar incluem a hipóxia crônica (Stenmark et al., 1985; Voelkel, 1986; Weir e Archer, 1995), lavado bronco-alveolar com conseqüente depleção de surfactante (Fehrenbach, 2003), modelo mecânico de obstrução de via aérea superior para indução de *Cor pulmonale* (Mauad e Waichert, 2004) e indução por lesão química pela monocrotalina. Em se tratando do presente estudo, utilizamos o modelo experimental de Hipertensão Pulmonar induzido pela Monocrotalina.

A Monocrotalina (MCT) é um alcalóide tóxico extraído da semente da espécie *Crotalária*. Apesar da intoxicação com MCT ter sido utilizada como modelo de hipertensão pulmonar desde 1961, o mecanismo pelo qual a MCT causa toxicidade pulmonar ainda não está bem determinado (Wilson et al., 1992). Estudos recentes apontam um desequilíbrio entre os fatores contráteis derivados do endotélio e fatores relaxantes, com elevada produção de endotelina (ET-1) endógena (Morita et al., 1996; Frasch et al., 1999; Jasmin et al., 2003), além de déficit na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) bioativo (Mathew et al. 1997).

Quando administrada sistemicamente, o leito arterial primeiramente encontrado pelo metabólito é a circulação pulmonar, lesando assim, preferencialmente, o endotélio arterial pulmonar (Lafranconi e Huxtable, 1984; Yan e Huxtable, 1996). Como resultado da lesão, um animal tratado com MCT exibe alterações vasculares pulmonares iniciando com um edema sub-intimal leve nos capilares do septo interalveolar e paredes dos ductos alveolares (Taylor et al., 1997). Essas alterações progridem para vasculite proliferativa e, subseqüentemente, *cor pulmonale* e hipertensão pulmonar (Meyrick e Reid, 1982; Wilson et al., 1989), caracterizado por um aumento na resistência arterial pulmonar e hipertrofia de ventrículo direito (Meyrick e Reid, 1982; Bruner et

al., 1983; Van Suylen et al., 1997). Outros achados após a administração de MCT incluem edema pulmonar (Sugita et al., 1983; Bruner et al., 1983), aumento nas células intersticiais (Bruner et al., 1983) e hipertrofia da camada média do músculo liso vascular (Meyrick e Reid, 1982; Suylen et al, 1998). Achados pulmonares tais como edema intersticial, inflamação, hemorragia e fibrose também foram encontrados, bem como infiltrado inflamatório alveolar (Stenmark et al., 1985; Wilson et al., 1989).

Por essas características, esse alcalóide tem sido usado como um modelo para explorar o processo de hipertensão pulmonar e a resultante hipertrofia cardíaca, assim como auxiliar no entendimento de fatores que contribuem para a progressão da doença e na identificação de novas formas de tratamento da HP.

Apesar de vários estudos enfocarem as alterações cardiovasculares e respiratórias que ocorrem na HP, alguns aspectos ainda permanece por serem esclarecidos. Dentre eles destacam-se possíveis alterações nos mecanismos de regulação da PA, bem como a investigação dos ajustes respiratórios até mesmo para um melhor manejo dos pacientes acometidos por esta doença.

A regulação efetiva da pressão arterial é o resultado da ativação de sistemas de retroalimentação que operam a curto e em longo prazo. O principal mecanismo de controle em curto prazo é desempenhado pelos reflexos que são originados nos barorreceptores arteriais e nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar (Shepherd e Mancia, 1986).

Os ajustes reflexos ocorrem principalmente através da ativação dos barorreceptores aórticos e carotídeos que transmitem informações ao sistema nervoso central (SNC). As aferências provenientes dos barorreceptores arteriais para o SNC e as eferências autonômicas que partem deste para o coração e vasos sanguíneos, constituem um mecanismo de retroalimentação, o qual permite a regulação da pressão arterial (PA) batimento-a-batimento (Jacob et al., 1986, 1988).

Em condições normais, a pressão arterial média no homem, assim como em mamíferos usados na experimentação animal, é mantida dentro de estreitos limites, assegurando uma perfusão ideal para todos os tecidos. Para isso, as variáveis hemodinâmicas, tais como o débito cardíaco e a resistência periférica são continuamente ajustados por mecanismos reflexos a fim de manter a pressão arterial com a menor variação possível (Spyer, 1990).

O barorreflexo é o mais conhecido dos mecanismos neurais para o controle da PA. Este reflexo promove sua ação sobre a regulação da PA por meio de mecanorreceptores localizados nas paredes do arco aórtico e do seio carotídeo. Estes receptores são sensíveis às alterações de tensão produzida na parede dos vasos pelas ondas de pressão sistólica ou por elevações súbitas da PA (Brown, 1980; Spyer, 1990). A ativação destes receptores gera potenciais de ação, os quais são transmitidos ao SNC por meio de aferências baroreceptoras que caminham juntamente com os nervos vago e glossofaríngeo. Quando ocorre um aumento súbito da PA, a conseqüente ativação do barorreflexo promove simultaneamente uma elevação da atividade parassimpática ao coração e uma diminuição da atividade simpática, tanto para os vasos de resistência, quanto para o coração (Spyer, 1990). Isso resulta em bradicardia, redução da contratilidade cardíaca, redução da resistência vascular periférica e consequentemente, uma diminuição do débito cardíaco e da PA. Em contrapartida, a queda da PA é compensada por um decréscimo na descarga aferente barorreceptora, promovendo alterações exatamente opostas às acima descritas para os componentes autonômicos (Brown, 1980; Michelini, 1989).

Assim, por ocasionar o controle da freqüência cardíaca e da pressão arterial, o barorreflexo provê uma poderosa regulação de feedback negativo, batimento-a-batimento da pressão arterial sanguínea que minimiza as flutuações na pressão. Assim como o diagnóstico e tratamento da hipertensão arterial focados no nível basal da pressão sanguínea determinam grande redução

da morbidade e mortalidade da população, a variabilidade momento a momento da pressão arterial por si, cujo controle é função do barorreflexo, é também de importante significado clínico.

Um outro reflexo cardiovascular que desempenha importante função no controle da PA é o reflexo de Bezold-Jarisch (B-J), um epônimo para uma tríade de respostas cardiorespiratórias (apnéa, bradicardia e hipotensão) promovidas pela injeção intravenosa de alcalóides do *Veratrum* em animais experimentais. A observação foi primeiramente reportada em 1867 por Von Bezold e Hirt e confirmada em 1938-1940 por Jarisch. A tríade de respostas é mediada por núcleos localizados no tronco cerebral que controlam a respiração, a freqüência cardíaca e o tônus vasomotor, a partir de informações transmitidas através de aferentes vagais cardíacos (Aviado e Aviado, 2001). Este reflexo possui receptores localizados em diferentes estruturas da região cardiopulmonar, incluindo átrios, ventrículos, vasos e parênquima pulmonar (Kappagoda et al., 1972; Thorén, 1980). São receptores de baixa pressão, sendo mais sensíveis às mudanças de pressão diastólica final do VE, em contraste com os barorreceptores aórticos e carotídeos que são receptores de alta pressão.

Possuem terminações mecano-sensitivas e quimio-sensitivas, sendo que o reflexo B-J pode ser facilmente evocado experimentalmente por injeções de 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou fenilbiguanida (FBG) (Meyrelles et al., 1994; Mark e Mancia, 1994; Ustinova e Schultz, 1994a).

Finalmente, o sistema de quimiorreceptores arteriais periféricos também faz parte da primeira linha de controle da pressão arterial. As células quimiosensíveis estão localizadas em uma estrutura denominada corpúsculo carotídeo, bilateralmente, na bifurcação carotídea. Estes corpúsculos são irrigados por uma pequena artéria, a qual se origina na parte interna desta bifurcação, permitindo o seu íntimo e contínuo contato com o sangue arterial. As células do corpúsculo são divididas em 2 tipos: células tipo I ou glomus e células tipo II ou de sustentação. As células do tipo I são mais numerosas no corpúsculo carotídeo e são responsáveis pela quimiotransdução (López-Barneo et al., 1993). Estas células contêm grânulos citosólicos contendo catecolaminas, secretam dopamina e outros possíveis neurotransmissores em resposta às alterações da composição dos fluidos corporais, e estabelecem,

morfologicamente, sinapses com terminações aferentes do nervo do seio carotídeo. Quando ocorrem alterações da PaO2, PaCO2 ou pH, essas células são excitadas e liberam um neurotransmissor que irá estimular as terminações do nervo do seio carotídeo transmitindo sinais nervosos para o SNC (González et al., 1992).

Ativação dos quimiorreceptores periféricos resulta em ajustes ventilatórios que se caracterizam por aumento no volume corrente, na freqüência respiratória e no volume-minuto, exercendo, portanto, um importante papel no controle reflexo da ventilação (Daly et al., 1965).

Estudos anteriores (Mauad e Machado, 1998; Franchini e Krieger, 1999; Amaral 1999, 2004; Haibara et al., 2002) tem mostrado que a estimulação do quimiorreflexo perifericamente com cianeto de potássio em ratos não-anestesiados promove respostas pressora e bradicárdica, caracterizando-o como um reflexo cardiovascular excitatório. Estudos de Haibara et al. (1995) mostraram ainda, utilizando bloqueadores autonômicos seletivos, que estas respostas são ativadas de forma independente, uma vez que o pré-tratamento com prazosin (antagonista seletivo dos receptores α-1) atenuou a resposta pressora sem alterar a resposta da bradicardia. Dessa forma, o papel fisiológico dos quimiorreceptores periféricos está relacionado à promoção de ajustes ventilatórios e cardiovasculares no sentido de proporcionar a manutenção da composição química do sangue em níveis ideais, bem como uma pressão de perfusão sanguínea adequada para todos os tecidos.

Além das respostas ventilatórias e cardiovasculares, a estimulação dos corpos carotídeos produz também alterações comportamentais autonômicas (defesa, piloereção, dilatação pupilar) em animais acordados, demonstrando assim que as áreas de defesa também são ativadas por estimulação quimiorreflexa (Lanfranchi e Somers, 2002).

A extensa quantidade de estudos disponíveis na literatura sobre os reflexos cardiovasculares demonstra a importância destes mecanismos neurais sobre a regulação da PA, tanto em condições de normotensão como nas mais variadas formas de hipertensão experimental e clínica. No entanto, não há disponível na literatura, estudos que tenham avaliado a função destes mecanismos reflexos neurais na hipertensão pulmonar experimental. Assim, o presente estudo se justifica por ser a Hipertensão Pulmonar uma das doenças vasculares mais graves, com alto índice de mortalidade e pela escassez em literatura, de pesquisas experimentais referentes aos sistemas cardiovascular e respiratório.

OBJETIVOS

Geral:

• Estudar as alterações cardiovasculares e respiratórias de ratos com hipertensão pulmonar induzidas pela monocrotalina.

Específicos:

- Avaliar as alterações hemodinâmicas decorrentes da hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina em ratos;
- Avaliar as respostas cardiovasculares reflexas (Barorreflexo, Reflexo Bezold-Jarisch e Quimiorreflexo) de ratos com hipertensão pulmonar induzidos pela monocrotalina;
- Avaliar os efeitos da hipertensão pulmonar induzidas por monocrotalina sobre o sistema respiratório e gasometria de ratos;
- Avaliar os efeitos da hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina sobre os componentes autonômicos cardíacos;
- Estudar as alterações anatomopatológicas da vasculatura pulmonar de ratos tratados com monocrotalina.

MATERIAL E MÉTODOS

1.0 - Local

Este estudo foi realizado no Laboratório de Regulação Central do Sistema Cardiovascular, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2.0 – Animais Experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar* provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo, com peso padronizado entre 220-240g. Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno, com controle de claro/escuro (12/12h), com livre acesso à água e à ração balanceada (Bio Base - BioTec 9301, Águas Frias, SC). Todos os experimentos foram desenvolvidos respeitando-se as normas de proteção aos animais.

3.0 – Anestesia

Previamente às cirurgias, os animais foram submetidos à anestesia com hidrato de cloral (10% IP) para cateterização da veia e artéria femoral, veia jugular e artéria carótida.

4.0 – Tratamento dos animais para indução da Hipertensão Pulmonar

A Hipertensão Pulmonar experimental foi induzida através de uma única aplicação de Monocrotalina (Crotaline; Sigma Chemical Co), injetada de forma sub-cutânea, na dose de 60 mg/kg/ml. A MCT foi inicialmente dissolvida em 1 N de ácido clorídrico (HCl). A seguir, o pH foi corrigido para 7,4 com uma solução de NaOH 0.5N. Uma vez dissolvido, o volume da solução foi ajustado para 7 ml com salina. Os experimentos nesses animais iniciaram-se 3 semanas após a aplicação da MCT, período necessário para a instalação da hipertensão pulmonar. Um grupo distinto de ratos foi utilizado como controle, e recebeu uma injeção sub-cutânea de salina (≈ 0,2 ml), 3 semanas antes do início dos experimentos.

Com a finalidade de acompanharmos a evolução do peso corporal dos animais, estes foram pesados no início do tratamento, isto é, no momento em que receberam a injeção de MCT ou salina, e após a 1ª, 2ª e 3ª semanas.

5.0 - Cateterização da veia e artéria femoral

Sob anestesia por hidrato de cloral, os animais foram submetidos ao implante de uma cânula na aorta abdominal, acessada através da artéria femoral esquerda, para permitir os registros cardiovasculares. Também foi inserido um catéter na veia cava inferior através da veia femoral, para administração de drogas, de acordo com cada protocolo experimental. As extremidades livres foram direcionadas, sob a pele no dorso do animal, por meio de um trocáter, até a região médio-cervical posterior, onde, por meio de nova incisão, os cateteres foram exteriorizados e fixados por meio de fio de sutura. As cânulas utilizadas para cateterização foram de polietileno, com duas partes soldadas entre si: PE-50 (CPL Medical's – São Paulo, Brasil) + PE-10 (Portex, USA). Estas foram preenchidas com solução fisiológica (0,9%) previamente a cateterização. Após a cirurgia, os animais foram colocados em caixas individuais, para permitir sua recuperação com água e ração *ad libitum*. No dia seguinte, antes do início dos registros, as cânulas foram heparinizadas (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) (1:50) para evitar a formação de coágulos durante o período de registros.

6.0 – Registro direto da pressão arterial e da freqüência cardíaca

Para os registros de Pressão Arterial Pulsátil (PAP), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC), a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Spectramed-Statham, P23XL, Oxnard, EUA), que por sua vez estava acoplado a um polígrafo (Hewlett Packard 7754B System de 4 canais) acoplado a um computador e a um sistema computadorizado de registros (BIOPAC). Para estes registros foi utilizada uma freqüência de amostragem de 200 Hz. A PAM e a FC foram obtidas a partir dos sinais de PAP.

7.0 – Registro pletismográfico de corpo inteiro

A técnica de pletismografia de corpo inteiro consiste de uma câmara acrílica, transparente, hermeticamente fechada, com volume de 2.095 ml, onde o animal é colocado (Figura 1). Esta câmara foi conectada a um transdutor de alta sensibilidade (modelo 270 – medical group HEWLETT PACKARD RANGE 4002º 1734 AO2988), conectado a um polígrafo de 4 canais (HEWLETT PACKARD 7754B SYSTEM), acoplado por sua vez a um sistema computadorizado de registros (BIOPAC), para permitir os registros das variações de pressão dentro da câmara, bem como da freqüência respiratória. A calibração do sistema foi feita através de uma seringa de 1 ml conectada à câmara pletismográfica, onde injeções de 0,1 e 0,2 ml foram feitas com o objetivo de se registrar as alterações de pressão dentro da câmara, as quais foram utilizadas nos cálculos dos volumes respiratórios.

A cânula arterial do animal foi exteriorizada da câmara através de um orifício na parede superior da mesma, o qual permaneceu preenchido com vaselina para assegurar o isolamento da câmera. A cânula arterial foi conectada ao polígrafo HEWLETT PACKARD e ao sistema de aquisição de dados BIOPAC, de forma que os registros de PA e respiratórios pudessem ser realizados simultaneamente.

Após um período de aproximadamente 15 a 20 minutos para a adaptação do animal à câmara pletismográfica, foram iniciados os registros. Foram realizados 5 períodos de registros por animal, sendo que cada um teve a duração de 5 minutos. Entre estes períodos de registros, a câmara foi aberta e assim permanecendo por 1 minuto, para permitir a renovação do ar da mesma. Para as análises dos dados não foi utilizado o primeiro período de registro, uma vez que neste, o animal encontrava-se em fase de adaptação à câmara (Mauad et al., 1992).



Figura 1 – Câmara pletismográfica

8.0 – Cálculo dos Parâmetros Ventilatórios

Para a quantificação do volume corrente (V_T), vários parâmetros foram considerados, de acordo com a seguinte equação descrita por Malan (1973):

 $V_{T} = VK \cdot \underbrace{\overset{\Delta PT}{}_{\Delta PK} T^{o}C}_{\Delta PK} \underbrace{\overset{Pb}{}_{T^{o}a} \underbrace{\overset{Pb}{}_{PCH_{2}O) - T^{o}C} (Pb - PcH_{2}O)}_{T^{o}L} - \underbrace{\overset{Pb}{}_{T^{o}L} T^{o}C}$

Onde:

 V_T = volume de ar corrente (unidade = ml)

VK= volume de ar injetado na câmara através da seringa de calibração (0,1; 0,2 ml, etc.)

△PT = variação de pressão dentro da câmara, na presença do animal. Este valor foi obtido a partir dos registros gráficos e corresponde a um valor em

centímetros de uma inspiração ou expiração. Para determinação deste, selecionou-se um segmento do registro onde o animal encontrava-se em repouso.

Foi feita a média aritmética de aproximadamente 10 inspirações ou expirações.

∆**PK** = é a variação de pressão dentro da câmara, sem o animal, causada pela injeção de um volume conhecido de ar na câmara, por ocasião da calibração do sistema. É um valor, em centímetros, obtido nos registros gráficos.

T°C = temperatura da câmara em °K obtida no momento do registro, após a adaptação do animal. Para isto, foi colocado um termômetro na parede interna da câmara.

T°a = temperatura ambiente em °K, observada por um termômetro localizado na sala de registro.

T^oL = temperatura do pulmão do animal em ^oK (311^oK, Barttlet, 1971)

Pb = pressão barométrica (unidade = TORR)

PcH₂O = pressão de vapor de água na câmara determinada em tabela a partir da T(°C) da câmara (unidade = TORR). (Vide tabela de conversão no Anexo

PLH₂O = pressão de vapor de água dos pulmões do animal determinada a partir da T(°C) dos pulmões (unidade = TORR). (Vide tabela de conversão no Anexo I).

8.1 – Fator de correção

Após a obtenção do volume corrente pelos cálculos descritos acima, foi feita uma correção para desconsiderar o espaço físico ocupado pelo animal dentro da câmara, no momento do registro.

	VC – Vrato
Fator de Correção =	
	VC

VOLUME CORRENTE CORRIGIDO = Eator de Correção V-	T

Onde:

VC = Volume da câmara sem o animal (unidade: mililitros)

Vrato = peso do animal (unidade: gramas).

8.2 – Outras Variáveis Ventilatórias Calculadas:

• <u>Frequência Respiratória (FR)</u>: calculada a partir dos registros ventilatórios. Foi feita a média aritmética dos 4 períodos de registros. Expressa em ciclos por minuto (cpm).

 <u>Volume-minuto (Vmin)</u>: calculada pelo produto entre o volume corrente corrigido e a freqüência respiratória. Os dados foram normalizados por Kg de rato.

9.0 – Avaliação gasométrica

Após os registros cardiovasculares e ventilatórios, foi retirada uma pequena amostra de sangue arterial (0,3 ml) em seringa previamente heparinizada, e levada, sob resfriamento, para realização de gasometria (Radiometer Copenhagen ABL555) no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM). Foram avaliados os seguintes parâmetros: $PaCO_2$ (pressão parcial sanguínea de dióxido de carbono), PaO_2 (pressão parcial sanguínea de oxigênio), HCO_3^- (bicarbonato), pH (potencial hidrogeniônico) e Sat Hb (saturação de hemoglobina), dos animais de ambos os grupos, salina (n=10) e MCT (n=8).

10.0 - Avaliação das pressões ventriculares

Para avaliarmos as pressões ventriculares, os animais do grupo salina (n=10) e monocrotalina (n=10) foram submetidos à anestesia com hidrato de cloral (10% IP), e logo em seguida foi realizada canulação da veia jugular e artéria carótida, para medida direta das pressões de câmaras cardíacas direita e esquerda, respectivamente. A pressão do ventrículo direito foi medida com o auxílio de um tubo de polietileno (PE-50) que foi levemente modificado por aquecimento e introduzido no ventrículo direito através da veia jugular externa direita. A pressão ventricular esquerda foi medida com um tubo de polietileno (PE-50), introduzido na artéria carótida direita através de uma pequena incisão, e avançado até a aorta descendente e ventrículo esquerdo. Os cateteres foram conectados a um transdutor de pressão e posicionados à altura do tórax do animal, sendo os transdutores conectados a um Sistema de Aquisição de Dados computadorizados (PowerLab), sendo os dados armazenados a uma amplitude de 100 Hz. A posição do cateter foi confirmada pela morfologia da onda no traçado de pressão na tela do monitor utilizando o software Chart V4.2 (PowerLab® ADInstruments, USA).
Foram mensuradas as seguintes pressões ventriculares: pressão ventricular sistólica (PVS), pressão ventricular diastólica (PVD), pressão ventricular diastólica final (PDF), derivada de pressão sobre o tempo positiva [dP/dT(⁺)], derivada de pressão sobre o tempo negativa [dP/dT(⁻)].

11.0 – Avaliação dos Reflexos Cardiovasculares

11.1 – Estimulação do Barorreflexo

O método utilizado para estimulação dos barorreceptores consistiu na infusão contínua, por meio de bomba de infusão (Harvard, 600-900V, Dover, EUA), de fenilefrina (Hidrocloridrato de fenilefrina – Sigma, EUA), na dose de 0,05 mg/ml, e nitroprussiato de sódio (Nipride, Roche, Brasil) na dose de 1,0 mg/ml. O fluxo utilizado foi de 50 µg/ml/min, o qual foi mantido até que obtivéssemos elevação ou diminuição da PAM de 50 mmHg em relação à linha de base. Posteriormente, os valores de FC correspondentes às alterações de PAM foram tomados em intervalos de ± 10 mmHg. A seguir, estes resultados foram avaliados através de um "software" específico para ajustes de curvas sigmoidais, de acordo com o modelo matemático desenvolvido por Marquardt (1963) e adaptado por Head e McCarty (1987), conforme fórmula abaixo:

FC = Pb + (Pt-Pb) / [1+exp (-4,56 . G) / (Pt-Pb) . (PA50-PAM)]

Onde:

FC = Freqüência cardíaca

- Pb = platô de bradicardia, que indica a resposta máxima de queda na FC induzida pelo aumento da pressão arterial
- Pt = platô de taquicardia, que indica a resposta máxima de aumento na FC induzida pelo decréscimo da pressão arterial

Pt - Pb = corresponde à faixa operacional do reflexo barorreceptor

G = ganho médio ou sensibilidade média do barorreflexo. É o parâmetro que governa a inclinação da curva. É a inclinação da curva entre 20 e 80% da faixa operacional do barorreflexo.

PA₅₀ = corresponde ao valor de PA no ponto de maior inclinação (slope) da curva. É o nível de pressão arterial no qual o barorreflexo mostra o ganho máximo.

PAM = pressão arterial média.

Estes parâmetros podem ser visualizados na Figura 2, onde representamos um modelo de curva sigmoidal barorreflexa.



Figura 2 – Curva sigmoidal Barorreflexa

Para obtenção do ganho máximo barorreflexo, obtido a partir da Primeira Derivada Logística Sigmoidal (PDLS), foi utilizada a seguinte fórmula:

PDLS = (R*((((-4.56*G)/R)*exp((-4.56*G)/R*(x-PA50)))/((1+exp((-4.56*G)/R*(x-PA50)))^2)))

11.2 – Estimulação do Reflexo Bezold-Jarisch

O Reflexo de Bezold-Jarisch foi induzido através de injeções (*in bolus*) em doses aleatórias de fenilbiguanida (FBG) (1,5; 3; 6; 12 e 24 μg/kg IV) e as alterações de PAM e FC foram registradas. A FBG estimula quimicamente os receptores cardiopulmonares por ativarem os receptores 5-HT₃, localizados nas câmaras cardíacas e vasos pulmonares (Brown, 1980; Mark, 1983).

11.3 – Estimulação dos Quimiorreceptores periféricos carotídeos

Os quimiorreceptores carotídeos foram ativados através de injeções aleatórias de Cianeto de Potássio (KCN) (10, 20, 40 e 80 µg/0,05 ml/rato IV), *in bolus*, e as alterações de PAM e FC foram então registradas. O Cianeto é descrito na literatura como um potente estímulo para os quimiorreceptores periféricos (Biscoe e Duchen, 1990; Franchini et al., 1997), atuando por inibição da enzima citocromo-oxidase envolvida na cadeia respiratória mitocondrial.

12.0 – Avaliação dos componentes autonômicos

O bloqueio autonômico foi realizado com a finalidade de avaliarmos os efeitos do tratamento com MCT sobre o componente simpático e parassimpático cardíaco, bem como auxiliar no entendimento das alterações cardiovasculares observadas.

Para tanto foram realizadas injeções do beta-bloqueador (ß₁) atenolol (2 mg/kg/ml, IV) e do anti-muscarínico metil-atropina (2 mg/kg/ml, IV). As alterações na FC basal foram analisadas antes e 15 minutos após cada bloqueio,

A avaliação do componente simpático foi feita subtraindo-se o valor da FC após o bloqueio com atenolol do valor da FC basal. Para o componente parassimpático, subtraiu-se o valor da FC obtido após o bloqueio combinado de atenolol + metil-atropina do valor de FC obtido após o bloqueio com atenolol.

13.0 – Determinação dos pesos seco e úmido das câmaras cardíacas, pulmão e fígado.

As câmaras cardíacas (ventrículos direito e esquerdo), pulmão e fígado, foram retirados após o experimento, separados e pesados em balança de precisão (AND – GR-200). Foi registrado o peso úmido ao final do experimento, bem como o peso seco, após 24 horas do tecido em estufa a 100°C para desidratação.

14.0 – Histologia pulmonar

14.1 – Métodos anátomo-patológicos

A confecção das lâminas e análise histológica foi realizada com a colaboração do professor Dr. Paulo R. Merçon Vargas (Departamento de Patologia – UFES), e o microscópio para análise das lâminas foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Carlos Alberto Redins (Departamento de Morfologia – UFES).

Antes da retirada dos pulmões, o animal foi exsanguinado, através de punção na cava inferior, e uma solução de heparina salinizada foi injetada no ventrículo direito. A solução heparinizada foi utilizada com a finalidade de se evitar lâminas com tecido pulmonar hemorrágico. A seguir, o animal foi traqueostomizado com o auxílio de um tubo de polietileno (PE-90) e acoplado a um ventilador mecânico para pequenos animais (Harvard Rodent Model 683) com o volume de 2,5 l/min e a frequência respiratória ajustada para 70 cpm. A caixa torácica foi aberta, e a seguir, ao final da fase inspiratória de um ciclo respiratório, a traquéia foi clampeada e amarrada a fim de se evitar o colabamento pulmonar. A retirada dos pulmões e coração foi "em bloco". Os pulmões foram fixados em paraformaldeído (4%) por 24 horas, e posteriormente, colocado em álcool etílico 75%.

Os espécimes foram então encaminhados ao serviço de patologia do HUCAM para a análise anatomopatológica. Nesta análise, cada lobo foi isolado e seccionado axialmente, obtendo-se um fragmento de cada lobo (5 por rato). Estes fragmentos foram acondicionados em cassete (1 por rato), desidratados em etanol e incluídos em parafina para microtomia. Cinco cortes de 5 micrômetros foram feitos de cada bloco e corados com hematoxilina/eosina (1 lâmina), ácido-pícrico-vermelho da Síria (1 lâmina) e orceína acética (1 lâmina), reservando-se duas lâminas para a necessidade de uma eventual nova coloração.

Para os propósitos desta pesquisa, especificamente identificar, comparativamente, variações na espessura média da camada média artério-arteriolar entre os grupos salina (n=4) e monocrotalina (n=6), empregou-se o método proposto por Cook & Yates (1972, apud Aherne 1982). Por este método, estima-se morfometricamente, dois parâmetros:

comprimento (C) da limitante elástica interna (I) através da contagem das intersecções em uma gratícula quadrática de linhas com espaçamento
(d) com a imagem da li, pela fórmula:

 $CI = (\pi/4) \times Ii \times d$

área de secção transversal da túnica média (am), através da técnica de contagem de pontos em gratícula regular de pontos com espaçamento
(d) e área por ponto (a/p), através da fórmula:

am= ΣPi x a/p

A partir destes dois parâmetros, três variáveis vasculares são calculadas:

• raio do vaso (r), pela fórmula:

r= I /(2π)

• espessura da túnica média (tm), pela fórmula:

- tm = $(-5 + (r^2 + (am^2/\pi))^{1/2})$
- quociente parede-luz (tm/r)

Cook & Yates (1972, apud Aherne, 1982) recomendam a adoção destes parâmetros e métodos porque permite calcular o raio do vaso a partir do comprimento real de uma linha sinuosa (a limitante elástica interna), compensando assim o colapso vascular agônico e secundário à retração da fixação, condição esta, certamente, não fisiológica. A espessura da túnica média expressa em termos do quociente (tm/r) constitui uma medida flexível que permite comparar vasos que não são precisamente do mesmo diâmetro e, ademais, asseveram estes autores, este quociente tende a apresentar menor dispersão que valores da espessura isoladamente. A opção por empregar um método manual para estimar as duas quantidades recomendadas, resultou de duas constatações: textos recentes de estereologia (Gundersen et al., 1981 e Howard & Reed, 2005) e, utilizando-se esta metodologia, manualmente, sabe-se tanto o que se está medindo, como fica aparente sua determinação pelos cálculos matemáticos.

Os cortes histológicos corados pela orceína acética foram examinados, considerando-se o máximo de campos microscópios não-coincidentes de cada lâmina em microscópio ótico (Olympus AX70, Model U-MPH; Japan). Para aquisição das imagens processadas pelo software, as peças foram fotografadas com câmera digital fixa a uma estativa fotográfica (Pentax), mantendo uma distância constante. Artérias de médio e pequeno tamanho e arteríolas foram identificadas por apresentarem tanto a limitante elástica interna como a limitante elástica externa, facilmente visíveis. Aquelas que se apresentavam com secções arredondadas ou ovaladas foram fotografadas com aumento de 200X (ocular 10X, objetiva 20X). Nestas mesmas condições, foi fotografado um micrômetro objeto para calibração da magnificação linear.

As fotografias digitais foram impressas em papel com tamanho A4 (magnificação linear de 198 mm), utilizando-se impressora Xerox Workcentre 312, com resolução de 1200x600 pontos por polegada. A seguir, sobrepondo-se um plástico transparente à fotografia, traçou-se o perfil de cada vaso, seguindo-

se tão precisamente quanto possível, as limitantes elásticas. Nos perfís vasculares assim traçados, sobrepôs-se a gratícula e procedeu-se à contagem, seguindo as recomendações de Piris & McIntyre (1981), Gundersen et al. (1981) e Howard & Reed (2005).

15.0 – Drogas e Substâncias Utilizadas

- Cianeto de Potássio (KCN) (Sigma, St. Louis, EUA)
- Nitroprussiato de Sódio (Nipride, Roche, Brasil)
- Fenilefrina (Hidrocloridrato de fenilefrina, Sigma, St. Louis, EUA)
- Fenilbiguanida (Sigma, St. Louis, EUA)
- Atenolol (Sigma, St Louis, EUA)
- Metil-atropina (Sigma, St Louis, EUA)
- Crotalina (Sigma, St. Louis, EUA)
- Heparina (Liquemine, Roche, RJ, Brasil)
- Hidrato de cloral (Merck, Brasil)
- Solução fisiológica (salina 0,9%)
- Álcool etílico (75%)
- Paraformaldeído (4%)

16.0 – Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média ± EPM (erro padrão da média). Os métodos estatísticos utilizados foram: Teste *t*-Student para amostras pareadas e não-pareadas e análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, com análise *pos-hoc* pelo teste de Tukey, os quais foram empregados conforme o protocolo experimental realizado. As diferenças estatísticas foram fixadas como sendo significativas para *p<0,05 e **p<0,01.

17.0 - Protocolos experimentais

Vale salientar que todos os animais do grupo MCT foram avaliados no início da terceira semana após injeção de monocrotalina, e comparados com o grupo salina.

17.1 – Avaliação Cardiovascular, Respiratória e Gasométrica

As medidas cardiovasculares e respiratórias foram realizadas simultâneamente, através de registro pletismográfico de corpo inteiro, conforme descrito anteriormente. Este animal teve artéria femoral canulada um dia anterior ao experimento. No dia da realização dos experimentos, após um período de aproximadamente 15 a 20 minutos para a adaptação do animal à câmara pletismográfica, foram iniciados os registros. Foram realizados 5 períodos de registros por animal, com duração de 5 minutos cada. Entre estes períodos de registros a câmara foi aberta e assim permanecendo por 1 minuto para permitir a renovação do ar da câmara. Após os registros, foi realizada avaliação gasométrica, retirando-se amostra de 0,3 ml do sangue arterial em seringa previamente heparinizada e levada sob resfriamento para análise dos gases sanguíneos, tanto do grupo monocrotalina (n=8) como salina (n=10).

17.2 – Avaliação das pressões ventriculares

Para avaliarmos as pressões ventriculares, os animais do grupo salina (n=10) e monocrotalina (n=10) foram anestesiados, e logo em seguida foi realizada canulação da veia jugular e artéria carótida, para medida direta dos ventrículos direito e esquerdo, respectivamente. Após o procedimento de cateterização, um período de 10 minutos de estabilização foi aguardado antes das medidas serem registradas. Foi feita a média aritmética de 10 traçados de onda diretamente do Sistema POWERLAB, descartando-se, entretanto, o primeiro período de registros.

17.3 – Avaliação dos Reflexos Cardiovasculares

17.3.1 – Avaliação do Barorreflexo

Com o objetivo de avaliarmos a função barorreflexa, um grupo distinto de ratos dos grupos salina (n=9) e monocrotalina (n=10) tiveram as artéria e veia femoral canuladas. No dia seguinte, foram submetidos aos registros cardiovasculares. No dia dos experimentos, após um período de 15 minutos para a adaptação do animal à sala de registros, o experimento foi iniciado. A avaliação do barorreflexo foi feita através de infusão contínua de fenilefrina (substância vasoconstritora) e nitroprussiato de sódio (substância vasodilatadora), para obtenção de uma variação de PA de 50 mmHg. As alterações reflexas na FC, que serviram de parâmetros para avaliação da função barorreflexa, foram quantificadas.

17.3.2 – Avaliação do Reflexo de Bezold-Jarisch

Para avaliarmos o Reflexo de Bezold-Jarisch, na intenção de averiguarmos a influência do tratamento com a monocrotalina sobre o mesmo, um grupo de ratos tratados com monocrotalina (n = 8) e salina (n = 10) teve as artéria e veia femoral canuladas e no dia seguinte foram submetidos aos registros da PA e FC. No dia do experimento, após um período de 15 min para a adaptação do animal, foi iniciado o protocolo experimental. O reflexo de Bezold-Jarisch foi avaliado através de injeções aleatórias de fenilbiguanida (1,5; 3; 6; 12; 24 µg/kg/rato IV) com um intervalo de 10 minutos entre as doses. Terminado o experimento, o coração, pulmão e fígado do animal foram retirados. As câmaras cardíacas foram separadas e pesadas, bem como os pulmões e fígados, e posteriormente colocados em estufa a 100°C. No dia seguinte foram novamente pesados para avaliação do peso seco.

17.3.3 – Avaliação do quimiorreflexo

Para avaliarmos a influência do tratamento com monocrotalina sobre o quimiorreflexo, um grupo distinto de animais do grupo monocrotalina (n=8) e salina (n=10) tiveram as artéria e veia femoral canuladas e no dia seguinte foram submetidos aos registros de PA e FC. Após a adaptação do animal, foi iniciado o protocolo experimental. A avaliação do quimiorreflexo foi realizada através de injeções de doses aleatórias de KCN nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 µg/rato IV, com um intervalo de 10 minutos entre as doses.

17.4 – Bloqueio autonômico

Sob anestesia com hidrato de cloral (10% IP), um grupo de animais tratados cronicamente com monocrotalina (n=6) e salina (n=8) foram submetidos à canulação das artéria e veia femorais. No dia seguinte, com os animais acordados e adaptados à sala de registros, a avaliação da atividade autonômica foi realizada. Inicialmente, os valores de FC basal foram obtidos antes dos bloqueios. A seguir, foi feita a injeção de atenolol e após 15 min para permitir a efetividade do bloqueio beta-adrenérgico, a FC basal foi obtida. Por fim, foi feita a injeção de metil-atropina e após 15 min para a efetividade do bloqueio colinérgico muscarínico, a FC basal foi obtida.

17.5 – Histologia Pulmonar

Terminado o protocolo de avaliação das pressões ventriculares, e ainda sob efeito da anestesia, procedeu-se à retirada dos pulmões dos ratos tratados com MCT (n=6) e salina (n=4) para posterior análise histológica, conforme descrito anteriormente.

RESULTADOS¹

1.0 - PESO CORPORAL

Na Figura 3 apresentamos o peso corporal dos animais dos grupos salina e monocrotalina, os quais tiveram seu peso corporal registrado por 3 semanas, isto é, no início do tratamento (dia 0), e ao completar a 1^a, 2^a e 3^a semanas após injeção de salina e monocrotalina. Podemos observar que os animais do grupo monocrotalina (n=21) tiveram menor ganho de peso quando comparados aos animais do grupo salina (n=31) na 2^a semana (269±4* *vs* 283±5 g, respectivamente. *p<0,05) e na 3^a semana (285±4** *vs* 304±4 g, respectivamente. *p<0,01).



Figura 3 – Peso corporal dos animais ao início do tratamento e ao completar a 1ª, 2ª e 3ª semanas após injeção de monocrotalina ou salina. *p<0,05 e **p<0,01 indicam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

¹ Os valores individuais dos animais de cada protocolo experimental bem como a média ± erro padrão da média estão apresentados no APÊNDICE, no final desta dissertação.

2.0 - VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQÜÊNCIA CARDÍACA (FC)

Na Figura 4 apresentamos os valores basais de PAM e FC dos grupos salina e monocrotalina. Podemos observar que não houve diferença significante no valor da PAM basal entre o grupo salina (n=35) e o grupo MCT (n=30) (110±2 vs 104±3 mmHg, respectivamente) (Figura 4A). Por outro lado, encontramos um aumento estatisticamente significante na FC média basal do grupo MCT com relação ao grupo salina (389±9** vs 358±5 bpm, respectivamente **p<0,01) (Figura 4B).





Figura 4 – Valores basais de PAM (A) e FC (B) média dos grupos salina e monocrotalina. **p<0,01 significa diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

3.0 - REGISTROS VENTILATÓRIOS

Na Figura 5, apresentamos os valores de volume corrente (VC), freqüência respiratória (FR) e volume-minuto (Vmin) dos animais do grupo salina e monocrotalina. Inicialmente, podemos observar um aumento significativo no VC no grupo monocrotalina (n=20) em relação ao grupo salina (n=10) (7,9 \pm 0,3** vs 6,8 \pm 0,2 ml.kg⁻¹, respectivamente. **p<0,01) (Figura 5A). Aumentos significativos também foram observados em relação a FR (123 \pm 8* vs 105 \pm 2 cpm, respectivamente. *p<0,05) (Figura 5B) e no Vmin (960 \pm 67** vs 715 \pm 26 ml.kg⁻¹.min⁻¹, respectivamente. **p<0,01) (Figura 5C).

4.0 - GASOMETRIA

Na Figura 6, apresentamos os valores da pressão parcial de O₂ no sangue arterial (PaO₂) e da porcentagem de saturação de Hemoglobina (%Sat Hb) dos grupos salina e monocrotalina. Inicialmente, podemos observar uma diminuição significativa nos níveis de PaO₂ do grupo monocrotalina quando comparado ao grupo salina (84±2,7* vs 96,4±3,2 mmHg; respectivamente. *p<0,05) (Figura 6A). Na Figura 6B, observamos que a % Sat Hb também foi menor no grupo monocrotalina em relação ao grupo salina (96,5±0,4* vs 97,8±0,2 %; respectivamente. *p<0,05).





Figura 5 – Valores de Volume Corrente (V_T) (A), Freqüência Respiratória (FR) (B) e de Volume-minuto (Vmin) (C) de animais dos grupos salina (n=10) e monocrotalina (n=20). *p<0,05 e **p<0,01 representam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.





Figura 6 – Valores gasométricos da Pressão parcial de Oxigênio no sangue arterial (PaO₂) (A) e da porcentagem de saturação de hemoglobina (%Sat Hb) (B). *p<0.05 representa diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

Na Figura 7, apresentamos os valores do potencial hidrogeniônico (pH), concentração de íons hidrogênio (H^+), pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial (PaCO₂) e dos íons bicarbonato (HCO₃⁻) dos grupos salina e monocrotalina. Podemos observar que não houveram diferenças significativas em relação a estes parâmetros entre os grupos estudados.







Figura 7 – Valores gasométricos do potencial hidrogênico (pH) (A), da pressão arterial de dióxido de carbônio (PaCO₂) e do bicarbonato (HCO₃⁻). 5.0 - PRESSÕES VENTRICULARES

5.1- Pressão de Ventrículo Direito (VD)

Na Tabela I apresentamos os valores da pressão sistólica máxima (PS max), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), derivada de pressão / tempo negativa [dP/dT(⁻)] do ventrículo direito (VD) dos animais do grupo salina e monocrotalina. Inicialmente, podemos observar um aumento significativo na PS do VD no grupo monocrotalina (n=10) em relação ao grupo salina (n=10) ($55,1\pm2,9^{**}$ vs $25,8\pm0,7$ mmHg, respectivamente. **p<0,01). Aumentos significativos também foram observados na PDI ($7,4\pm1,3^{**}$ vs $2,4\pm0,2$ mmHg, respectivamente. **p<0,01), PDF ($11,4\pm1,4^{**}$ vs $5,0\pm0,04$ mmHg, respectivamente. **p<0,01), na dP/dT⁺ ($1206\pm51^{**}$ vs 569 ± 7 mmHg/s, respectivamente) e na dP/dT⁻ ($1186\pm98^{**}$ vs 589 ± 10 mmHg/s, respectivamente. **p<0,01).

5.2 - Pressão de Ventrículo Esquerdo (VE)

Na Tabela II apresentamos os valores de pressão sistólica máxima (PS max), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), derivada de pressão / tempo negativa [dP/dT(⁻)] do ventrículo esquerdo (VE) dos animais dos grupos salina (n=10) e monocrotalina (n=10). Podemos observar que não houve diferenças significativas em relação aos parâmetros pressóricos entre os grupos estudados.

Tabela I - Valores de pressão sistólica máxima (PS max), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), e derivadas positiva e negativa da pressão / tempo do ventrículo direito em ratos dos grupos salina (n=10) e monocrotalina (n=10).

	Grupos	
Parâmetros	Salina	Monocrotalina
PS max (mmHg)	26 ± 1	55 ± 3**
PDI (mmHg)	2,4±0,2	$7,4 \pm 1,3^{**}$
PDF (mmHg)	$5\pm0,04$	$11,4 \pm 1,4**$
dP/dT (+) (mmHg/s)	569 ± 7	1206 ± 51 **
dP/dT (⁻) (mmHg/s)	589 ± 10	1186 ± 98**

** p<0,01 indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

Tabela II - Valores de pressão sistólica máxima (PS max), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), e derivadas positiva e negativa da pressão / tempo do ventrículo esquerdo em ratos dos grupos salina e monocrotalina.

	Grupos	
Parâmetros	Salina	Monocrotalina
PS (mmHg)	126 ± 1	124 ± 2
PDI (mmHg)	$-1,5\pm0,07$	$-1,7\pm0,1$
PDF (mmHg)	$9\pm0,2$	$9\pm0,2$
dP/dT (⁻) (mmHg/s)	2680 ± 32	$\textbf{2720} \pm \textbf{54}$
dP/dT (⁺) (mmHg/s)	2756 ± 22	2805 ± 62

6.0 - REFLEXOS CARDIOVASCULARES

6.1. Avaliação do barorreflexo em ratos submetidos à hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina

Na Figura 8 apresentamos as barocurvas e a primeira derivada logística sigmoidal dos grupos salina e monocrotalina. Podemos observar que no grupo monocrotalina, a barocurva sigmoidal apresenta uma alteração na sua inclinação (slope) se comparada ao grupo salina (Figura 8A). Esta alteração pode ser melhor visualizada na Figura 8B, através da primeira derivada logística sigmoidal, onde plotamos os valores do ganho barorreflexo máximo em função dos valores de PAM. Podemos observar uma significativa diminuição do ganho médio do grupo monocrotalina em relação ao grupo salina (-2,67±0,2* vs. -5,22±1,0 bpm/mmHg, respectivamente. *p<0,05).

Na Tabela III apresentamos a média dos dados das barocurvas, bem como dos ganhos médios do barorreflexo dos animais dos grupos salina e monocrotalina. Os valores basais de PAM encontrados nos grupos salina e monocrotalina foram, respectivamente, 112,5±3,23 e 107,5±6,18 mmHg, enquanto os valores basais de FC encontrados no grupo monocrotalina foram significativamente maiores que o grupo salina (402±16* *vs* 348±9,38 bpm, respectivamente, *p<0,05). Podemos observar que não houveram diferenças significativas entre os grupos estudados em relação aos parâmetros platô de bradicardia, platô de taquicardia, amplitude e PA₅₀. Uma significativa redução do ganho médio foi observada no grupo monocrotalina em relação ao grupo salina.





Figura 8 – Barocurvas sigmoidais (A) e a primeira derivada logística sigmoidal (ganho máximo) (B) de animais do grupo salina e monocrotalina. *p<0,05 representa diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

Tabela III - Valores de pressão arterial média (PAM), freqüência cardícada (FC), platôs de bradicardia e taquicardia, amplitude, PA₅₀ e ganho médio, de ratos submetidos à avaliação do barorreflexo pela infusão contínua de fenilefrina e nitroprussiato de sódio dos grupos salina (n=8) e monocrotalina (n=8).

Parâmetros	Grupos	
	Salina	Monocrotalina
PAM (mmHg)	112 ± 3	107 ± 6
FC (bpm)	348 ± 9	$402\pm16^{\star}$
Platô de bradicardia (bpm)	250 ± 12	276 ± 16
Platô de taquicardia (bpm)	454 ± 17	466 ± 17
Amplitude (bpm)	204 ± 7	189 ± 17
PA ₅₀ (mmHg)	117 ± 3	116 ± 5
Ganho médio (bpm/mmHg)	$\textbf{-5,22}\pm 1$	-2,67 \pm 0,2*

*p<0,05 e ** p<0,01 indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

PA₅₀, pressão arterial média no ponto médio da curva. **p<0,01 e *p<0,05 indicam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

6.2. Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch (B-J) em ratos submetidos à hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina

Na Figura 9, apresentamos os valores das alterações de PAM e FC em resposta à injeção de fenilbiguanida em animais do grupo salina (n=9) e monocrotalina (n=9). Inicialmente, podemos observar na Figura 9A, que não houve diferenças significativas na Δ PAM entre os grupos estudados. Por outro lado, foi observado um aumento significativo na Δ FC do grupo MCT em relação ao grupo salina (Figura 9B) nas doses de 6 µg/kg (-241±11** *vs* –127±6 bpm, respectivamente. **p<0,01) e 12 µg/kg (-302±12** *vs* –205±7 bpm, respectivamente. **p<0,01).





Figura 9 - Variação de pressão arterial média (Δ PAM) (A) e variação de freqüência cardíaca (Δ FC) (B) à estimulação de fenilbiguanida nas doses de 1,5; 3; 6; 12 e 24 µg/kg IV em ratos do grupo salina (n=9) e monocrotalina (n=9). **p<0,01 representa diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

6.3. Avaliação do quimiorreflexo em ratos submetidos à hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina

Na Figura 10, apresentamos os valores de variação da pressão arterial média (△PAM) e da freqüência cardíaca (△FC) em resposta às injeções de cianeto de potássio (KCN, 10, 20, 40 e 80 µg/0,05ml, IV) dos animais do grupo salina (n=9), e monocrotalina (n=8). Inicialmente, podemos observar (Figura

10A), uma significativa diminuição nos valores de PAM dos animais do grupo monocrotalina em relação ao grupo salina, nas doses de 20 μg/kg (31±2* vs 46±5 mmHg), 40 μg/kg (32±2* vs 50±6 mmHg) e 80μg/kg (33±3** vs 54±5 mmHg, respectivamente) (*p<0,05; **p<0,01).

Em relação à FC (Figura 10B) podemos observar uma atenuação significativa da resposta bradicárdica no grupo monocrotalina comparados ao grupo salina nas doses de 20 μ g/kg (-30±10** vs -217±19 bpm), 40 μ g/kg (-82±17** vs -240±11 bpm) e 80 μ g/kg (-101±22** vs -276±18 bpm, respectivamente) (**p<0,01).





Figura 10 – Variação da pressão arterial média (△PAM) (A) e de freqüência cardíaca (△FC) (B) nos grupos salina e monocrotalina. *p<0,05 e **p<0,01 representam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

7.0 - Avaliação autonômica

Na Figura 11, apresentamos os valores de FC basal (B) (antes dos bloqueios), após o bloqueio com Atenolol (A) e após o bloqueio com Atenolol e Metil-atropina (A+M). Estes bloqueios foram realizados a fim de obtermos uma estimativa da atuação dos componentes simpático (bloqueio com Atenolol) e parassimpático (bloqueio com Atenolol e Metil-atropina) sobre o coração dos grupos salina e monocrotalina.

Podemos observar inicialmente que o bloqueio com Atenolol promoveu uma redução de FC (em relação a FC basal) significativamente maior no grupo monocrotalina se comparado ao grupo salina (-60±11* vs -31±3 bpm, respectivamente. *p<0,05), sugerindo uma maior atividade do componente simpático no grupo monocrotalina. Observamos também que o bloqueio combinado (Atenolol + Metil-atropina) promoveu uma elevação da FC (em relação à FC após Atenolol) significativamente menor no grupo monocrotalina se comparada a do grupo salina (12±2** vs 55±6 bpm, respectivamente. *p<0,01), sugerindo uma importante atenuação do componente parassimpático no grupo monocrotalina.



Figura 11 – Valores de frequência cardíaca (FC) basal (B), após bloqueio com Atenolol (A) e após bloqueio com Atenolol + Metil-atropina (A+M). *p<0,05 e **p<0,01 representam diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

8.0 - PESO ÚMIDO E SECO DE CORAÇÃO, PULMÃO E FÍGADO

Na Figura 12A, apresentamos os valores de peso úmido e seco corrigido do ventrículo direito (VD) dos animais do grupo salina (n=10) e monocrotalina (n=10). Podemos observar um aumento significativo no peso úmido do VD do grupo monocrotalina com relação ao grupo salina (1,25±0,11** vs 0,5±0,02 mg/kg, respectivamente. **p<0,01). Também foi observado aumento significativo no peso seco de VD do grupo monocrotalina com relação ao grupo salina (0,25±0,04** vs 0,12±0,01 mg/kg, respectivamente. **p<0,01).

Na Figura 12B apresentamos os valores de peso úmido e seco do ventrículo esquerdo (VE) dos animais do grupo salina e monocrotalina. Podemos observar que não houve diferenças significativas nos valores de peso úmido e seco de VE entre os grupos estudados.

Na Figura 13A apresentamos os valores de peso úmido e seco dos pulmões, dos animais do grupo salina e monocrotalina. Podemos observar um aumento significativo no peso úmido de pulmões do grupo monocrotalina com relação ao grupo salina (7,8±0,7** *vs* 5,3±0,2 mg/kg, respectivamente. **p<0,01), bem como do peso seco de pulmões do grupo monocrotalina em relação ao grupo salina (1,73±0,10** *vs* 1,1±0,07 mg/kg, respectivamente. **p<0.01).

Na Figura 13B, apresentamos os valores de peso úmido e seco do fígado dos animais do grupo salina e monocrotalina. Podemos observar que não houve diferença significativa nos valores de peso úmido e seco corrigido do fígado entre os grupos estudados.




Figura 12 – Valores de peso úmido e seco de ventrículo direito (A) e de ventrículo esquerdo (B). **p<0,01 representa diferença estatisticamente significante em relação aos respectivos grupos salina.



Figura 13 – Valores de peso úmido e seco dos pulmões (A) e fígado (B). **p<0,01 representa diferença estatisticamente significante em relação aos respectivos grupos salina.

9.0 – HISTOLOGIA PULMONAR

Análise da histologia pulmonar evidenciou aumento significante na espessura da média das artérias pulmonares dos ratos tratados com MCT em relação ao grupo salina, conforme descrito na Tabela IV.

Nas Figuras 14, 15 e 16, apresentamos os gráficos correspondentes à distribuição das arteríolas entre os grupos salina e monocrotalina, a correlação entre raio / túnica média (R/TM) e a distribuição da espessura da média entre os grupos.

Nas Figuras 17 e 18, apresentamos as fotomicrografias representativas de cortes transversais de artérias pulmonares de um animal do grupo salina e de um animal submetido ao tratamento crônico com MCT, respectivamente.

Tabela IV - Parâmetros morfométricos vasculares do grupo MCT comparado com o grupo salina.

	Grupos	
Parâmetros	Salina	МСТ
Número de casos	4	6
Número de vasos	20	55
Espessura média da túnica média (µm)	9±3,2	12±7
Raio médio (µm)	71±28	59,3±27,3
Quociente espessura média/raio médio	0,138±0,063	0,212±0,097**

**p<0,01 indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.



Figura 14 - Distribuição do número de arteríolas pulmonares de acordo com o raio, nos ratos dos grupos salina e monocrotalina.



Figura 15 – Análise de correlação entre a relação TM/R e o raio das arteríolas pulmonares dos ratos dos grupos salina e monocrotalina. TM, túnica média; R, raio.



Figura 16 – Distribuição da espessura da média (TM/R) das arteríolas pulmonares nos ratos dos grupos salina e monocrotalina. TM, túnica média; R, raio. **p<0,01.



Figura 17 – Fotomicrografia representativa de uma secção transversal típica de uma artéria pulmonar de um animal do grupo salina, mostrando as lâminas elástica interna e externa. (Orceína, 20x)



Figura 18 – Fotomicrografia representativa de uma secção transversal típica de uma artéria pulmonar de um animal do grupo monocrotalina, mostrando hipertrofia acentuada da camada média com obliteração parcial do lúmen. (Orceína, 20x)

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a Hipertensão Arterial Pulmonar experimental induzida pela administração subcutânea de MCT em ratos promoveu alterações cardiovasculares e respiratórias caracterizadas principalmente por: a) aumento da FC basal; b) hipertrofia de VD, com conseqüente aumento das pressões sistólica e diastólica desenvolvidas por este ventrículo; c) aumento no volume corrente e na FR; d) hipoxemia; e) atenuação do ganho barorreflexo e das respostas quimiorreflexas cardiovasculares; f) exacerbação da resposta bradicárdica reflexa do reflexo de Bezold-Jarisch; g) exacerbação da atividade simpática e atenuação da atividade parassimpática e; h) hipertrofia da camada média das artérias e arteríolas pulmonares. O conjunto destes resultados mostra que a partir das alterações da vasculatura pulmonar promovidas pela MCT, segue-se um quadro evolutivo de alterações hemodinâmicas e cardiovasculares reflexas, bem como de alterações autonômicas e respiratórias. O modelo utilizado neste estudo para induzir a HP pode ser, inclusive, de grande importância para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos observados na HP e no *Cor Pulmonale*. Apesar dos estudos já realizados, dos quais a maioria foram em humanos, poucos mostraram as alterações funcionais sobre o sistema cardiorespiratório ao nível experimental, visando um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas alterações fisiopatológicas observadas nestas doenças.

A MCT é um alcalóide que, ao ser administrado sistemicamente, atua preferencialmente sobre o endotélio arterial pulmonar, lesando-o (Lafranconi et al., 1984; Yan et al., 1996). Existem vários estudos na literatura que utilizaram a MCT para promover a HP. Entretanto, tem sido observado que as doses de MCT, bem como o tempo para indução da HP variam significativamente entre estes estudos, além dos diferentes pesos dos animais utilizados.

1.0 - Alterações Anatomopatológicas da Vasculatura Pulmonar

Dentre as principais alterações que a MCT promove sobre a vasculatura pulmonar, destaca-se o aumento da resistência arterial pulmonar, devido a hipertrofia da camada média das artérias e arteríolas pulmonares. A ocorrência destas alterações na vasculatura pulmonar é o fator principal para o desenvolvimento da HP neste modelo, fato este que nos fez realizar a mensuração da espessura da camada média destes vasos.

As técnicas utilizadas para esta mensuração são variadas. Neste estudo foi utilizada a técnica recomendada por Cook e Yates (1972, *apud* Aherne 1982), uma vez que esta permite calcular o raio do vaso a partir do comprimento real da limitante elástica interna, compensando as deformações vasculares decorrentes da fixação do tecido pulmonar durante o processamento histológico.

Expressa sob a forma de quociente (TM/R), a espessura da túnica média dos animais tratados com MCT em nosso estudo, mostrou-se significativamente maior que o grupo tratado com salina, mostrando assim a existência de hipertrofia desta camada média arterial e arteriolar. Estes achados estão em acordo com outros estudos de Ito et al. (2000), Nagaya et al. (2003) e Lee et al. (2005).

Um aspecto que deve ser ressaltado em relação à técnica de Cook e Yates (1972, *apud* Aherne 1982) utilizada em nosso estudo refere-se ao fato de que esta constitui uma medida flexível que permite comparar vasos que não são precisamente do mesmo diâmetro, levando a uma menor dispersão dos valores da espessura desta camada média. A distribuição do número de arteríolas pulmonares de acordo com o raio mostrou que foram feitas medições de arteríolas de diferentes raios, embora a maioria tenha se situado entre 40 e 60 µm para o grupo MCT e de 40 a 80 µm para o grupo salina. Os valores da mediana do raio das arteríolas entre estes grupos (53 µm vs 63 µm) mostraram que a maioria das arteríolas destes grupos era de tamanho similar, apesar do número de arteríolas mensuradas de cada grupo ser diferente. Ademais, a existência de uma correlação negativa entre o raio das arteríolas e o quociente TM/R poderia sugerir que os vasos com menor raio apresentaram maior espessura da camada média, sugerindo que o aumento da resistência vascular ocorreu principalmente nas arteríolas de calibres menores.

120

O espessamento das arteríolas pulmonares promove um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo pulmonar e aumento nas pressões das câmaras cardíacas direita, levando às alterações cardíacas e aos sinais clínicos característicos da HP (hipertrofia de VD, fadiga, dispnéia e síncope, respectivamente). Entretanto, os mecanismos de ação que levam ao espessamento medial arteriolar pela MCT ainda não estão bem estabelecidos.

A menor eletronegatividade do potencial de membrana das células musculares da vasculatura pulmonar associado ao aumento da resistência vascular na HP induzida por MCT foi um dos mecanismos propostos por Ito et al (2000). Seus resultados mostraram que a lesão crônica do endotélio alterou a propriedade das artérias pulmonares, levando à despolarização das mesmas, o que favoreceria a ocorrência de vasoconstrição, contribuindo assim para a manutenção da HP.

Estudos de Gardner et al. (2004) e de Lee et al. (2005) mostraram que além da hipertrofia da camada média das artérias e arteríolas pulmonares, outros achados histopatológicos importantes foram documentados nos pulmões de ratos com HP induzida por MCT, tais como alveolite, inflamação angiocêntrica, espessamento septal alveolar e presença de hemorragia e macrófagos alveolares.

O mecanismo da hipóxia agindo sobre o remodelamento arterial pulmonar também tem sido alvo de estudos, uma vez que a exposição prolongada à hipóxia alveolar, está associada com o espessamento do lúmen da vasculatura pulmonar e, conseqüentemente, elevação na pressão arterial pulmonar. Após a exposição prolongada à hipóxia, o músculo liso vascular pulmonar exibe uma diminuição na corrente de potássio, despolarização de membranas e elevação na concentração de cálcio em repouso. Embora a etiologia dessas alterações permaneça por ser elucidada, tem sido proposto que estas, em resposta a hipóxia prolongada, promovem uma maior liberação de fatores vasoconstritores pelo endotélio (Shimoda et al., 2000).

Um estudo importante conduzido por Suylen et al. (1998) mostrou que o tipo de remodelamento arterial pulmonar é diferente na HP induzida por MCT e por hipóxia crônica. Estes autores mostraram que apesar de ambos os modelos apresentarem aumento na porcentagem de arteríolas muscularizadas, a hipertrofia da camada média foi mais pronunciada em ratos tratados com MCT. Além disso, o tipo de remodelamento arterial pulmonar entre estes modelos foi heterogêneo nos diferentes segmentos da árvore arterial pulmonar. No modelo da MCT, ocorreu hipertrofia medial das artérias pulmonares com diâmetros entre 30–100 µm e 101–200 µm. Uma redução da área do lúmen foi vista nas artérias pulmonares com um diâmetro externo entre 101-200 µm. No grupo submetido à hipóxia crônica, ocorreu somente um leve aumento da camada média, sem alterações na área do lúmen das artérias pulmonares com diâmetro entre 30-200 µm. Nossos resultados mostraram uma importante hipertrofia da camada média arteriolar do grupo MCT. Entretanto, por dificuldades técnicas, não foi possível a documentação de arteríolas com calibres menores que 50 µm. Estudos adicionais são necessários, visando a comparação de diferentes modelos de indução da HP, com observações criteriosas das alterações estruturais na vasculatura pulmonar.

2.0 – Avaliação do Peso Corporal

A redução no ganho de peso corporal observado nos animais tratados com MCT em relação ao grupo salina observada neste estudo, corrobora a outros trabalhos da literatura (Morita et al., 1996; Ito et al., 2000; Inoue et al., 2002; Nagaya et al., 2003; Kato et al., 2003; Lee et al., 2005; Nihei et al, 2005). Entretanto, apesar dos resultados similares, nenhum dos relatos justifica essa perda de peso corporal. Uma hipótese para explicar estes achados seria o fato desses animais apresentarem uma elevada FR, assim como aumento do esforço (trabalho) respiratório, o que poderia estar contribuindo para um gasto energético elevado, e conseqüentemente, uma redução do ganho de peso corporal. Outra hipótese a ser levantada seria a de que a MCT pudesse possuir, por si só, uma ação anorexígena. No entanto, estudos adicionais são necessários para averiguar esta hipótese, uma vez que neste estudo não foi quantificada a ingestão de ração dos animais.

3.0 – Avaliações Hemodinâmicas

Os estudos sobre as alterações hemodinâmicas cardiovasculares utilizando o modelo de HP pela MCT são controversos. Nossos resultados mostraram um valor basal de PAM similar entre os grupos estudados, enquanto que um aumento significante da FC média foi observado nos ratos tratados com MCT. Estudos anteriores de Sanyal e Ono (2002) também mostraram um aumento significante na FC média dos ratos tratados com MCT.

A ausência de diferença estatística nos valores médios da PAM em ratos tratados com MCT também foi relatada por estudos de Prié et al. (1998), Inoue et al. (2002) e Schermuly et al. (2005). Entretanto, estudos de Kato et al. (2003) não encontraram diferenças significativas, tanto na FC basal, como na PAM de animais tratados com MCT. No entanto, deve ser ressaltado que tanto o grupo controle como o grupo MCT, apresentaram valores de FC basal já elevados antes do tratamento (440±12 vs 406±21 bpm, respectivamente), além do fato do número de animais utilizados ser bastante reduzido (MCT: n=4; Controle: n=5).

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, algumas hipóteses poderiam ser discutidas para explicarmos o fato de termos encontrado este aumento significativo nos valores de FC basal nos ratos tratados com MCT: a) valores aumentados de FR; b) aumento da atividade do componente simpático; c) diferentes doses e via de administração de MCT e d) tempo de indução da HP.

A modulação de parâmetros cardiovasculares pelo sistema respiratório, tal como a freqüência cardíaca, têm sido proposta por vários investigadores ao longo das últimas décadas. Uma relação direta entre a atividade inspiratória e a inibição de respostas bradicárdicas foi proposta por Lopes e Palmer em 1976. Isto se baseia principalmente na existência de um mecanismo que promove a redução da FC, atuando de forma independente, seja através da atividade respiratória central ou através da distensão pulmonar.

Quando os pulmões são distendidos, a descarga pulmonar nervosa aferente impede o desenvolvimento de bradicardia pela estimulação do nervo do seio carotídeo (Lopes e Palmer, 1976). De fato, desde 1871, Hering demonstrou que a distensão pulmonar produz taquicardia. Isto se deve à ativação de receptores de estiramento localizados na musculatura lisa das vias aéreas, desde a traquéia até os bronquíolos (Zin, 1991). Estes receptores quando ativados enviam potenciais de ação ao sistema nervoso central, por meio de fibras vagais do tipo A, promovendo taquicardia por uma inibição da atividade eferente vagal (Abboud e Thames, 1979).

Os mecanismos envolvidos nesta inibição reflexa dos neurônios cardiovagais pelo estiramento pulmonar ainda não estão completamente esclarecidos. Há algumas evidências indicando que neurônios pós-inspiratórios são susceptíveis a inibição, cuja mediação seria através dos impulsos de

estiramento dos pulmões. Uma vez que os neurônios cardiovagais são considerados componentes da população de neurônios pós-inspiratórios, eles poderiam ser inibidos por tais impulsos (Spyer e Gilbey, 1988; Spyer, 1996; Gilbey e Spyer, 1997).

Adicionalmente, quaisquer modificações na atividade respiratória central têm efeitos imediatos e consideráveis sobre a FC (Jordan e Spyer, 1986). Uma clara manifestação desta integração cardiorespiratória é demonstrada pela flutuação da FC, mais conhecida como arritmia sinusal, onde a frequência de disparo de neurônios cardiovagais aumenta durante o período da expiração e reduz durante o período da inspiração (Spyer, 1996). Este processo parece envolver ambos os mecanismos, tanto o de origem periférica, promovendo a inibição parassimpática por impulsos aferentes vagais relacionados à distensão dos pulmões, quanto o de origem central, por aumento da atividade inspiratória central. Além disso, os efeitos da própria mecânica respiratória, ao induzir mudanças na pressão intratorácica, promove alterações na pressão transmural dos vasos sanguíneos intratorácicos e do coração. Estas alterações afetam diretamente o retorno venoso e o débito cardíaco, além da resistência pulmonar e aórtica, sugerindo assim, que alterações na respiração podem afetar diretamente a função cardiovascular (Spyer, 1996). Desta forma, o elevado valor de FR observado neste estudo em ratos tratados com MCT, poderia estar contribuindo para esta elevação da FC basal nestes animais.

Um outro fator que poderia explicar este elevado valor de FC observado no grupo MCT seria um aumento da atividade simpática cardíaca. De fato, nossos resultados mostraram, através de bloqueios autonômicos com atenolol e metil-atropina, que este componente está aumentado no grupo MCT. É sabido que a estimulação da inervação simpática-cardíaca promove aumento da FC através da estimulação dos adrenoceptores β1.

Em relação às doses de MCT, observamos que estas diferem entre os vários estudos. Estas doses variam de 40 a 70 mg/kg (Morita et al., 1996; Inoue et al., 2002). O tempo de indução para HP (3 a 5 semanas), bem como as cepas de ratos (Wistar ou Sprague-Dawley) e as vias de administração (subcutânea, intra-peritoneal) são outros aspectos que variam entre os estudos e poderiam explicar as diferenças em relação aos nossos resultados (Lee et al., 2005; Prié et al., 1998; Schultze e Roth, 1993; Suylen et al., 1998).

124

Em relação aos valores de PAM basal, não encontramos alterações significativas nos animais tratados com MCT no presente estudo. A presença de hipoxemia e a diminuição da saturação da Hb nestes animais poderiam contribuir para estes achados. Sabidamente, a presença destes fatores promove dilatação das arteríolas para aumentar o fluxo sanguíneo para os tecidos e, consequentemente, suprir as necessidades de O₂. Assim, uma certa diminuição da pressão arterial diastólica poderia ser observada em consequência desta queda de resistência periférica, o que promoveria um maior escoamento do sangue no sistema arterial, após o fechamento da válvula aórtica durante a sístole ventricular. Consequentemente, o decaimento da pressão arterial diastólica é maior. Por outro lado, esperar-se-ia um aumento da PAM por aumento do DC devido ao aumento da atividade simpática e da FC. Porém, a possível vasodilatação periférica acima descrita poderia estar sobrepujando a PAM, e, contrapondo-se a esta elevação. Como resultado final, observamos valores de PAM próximo à normalidade. Situação similar foi observada em ratos submetidos ao hipertireoidismo experimental (Mathias, 1999).

4.0 - Registros Respiratórios

No que diz respeito à técnica utilizada neste estudo para avaliação dos parâmetros respiratórios, ou seja, a "pletismografia de corpo inteiro", esta foi descrita inicialmente por Malan (1973). O princípio deste método consiste de uma câmara hermética onde o animal é colocado e cuja temperatura do ar da câmara difere da temperatura do ar dos pulmões do animal. As variações cíclicas da temperatura e pressão de vapor de água do volume corrente (inspiração/expiração) produzem variações de pressão na câmara, proporcional a esse volume corrente. Estas variações cíclicas na temperatura e pressão de vapor de água ocorrem a cada ciclo respiratório. À medida que a temperatura do ar da câmara se eleva devido à respiração do animal, há um aumento da pressão dentro da câmara. Este método tem a grande vantagem de permitir o registro dos parâmetros ventilatórios com o animal não-anestesiado. Outros trabalhos foram conduzidos utilizando-se esta técnica, tais como os estudos de Bartlett Jr (1971) e Mauad et al. (1992) em ratos.

O fato da câmara de registro pletismográfico causar um possível estresse sobre o animal foi uma questão anteriormente abordada (Mauad et al., 1992). As análises do possível estresse promovido pela câmara durante os períodos de registro mostraram que nos minutos iniciais, após a colocação dos animais dentro da câmara, estes

apresentavam uma série de comportamentos de caráter exploratório, e nesta fase, alguns parâmetros se encontravam alterados, tais como: FR, pressão arterial média e labilidade da pressão arterial. Porém, decorridos 20 minutos, os animais já se apresentavam tranqüilos e aparentemente adaptados à câmara com todas as variáveis alteradas retornando aos níveis basais.

As alterações ventilatórias têm sido pouco estudadas na HP experimental. Relatos subjetivos de "taquipnéia" em ratos tratados com MCT foram descritos no estudo de Nihei et al. (2005), porém sem uma quantificação deste e de outros achados ventilatórios. Outro relato subjetivo de aumento na FR no modelo de HP induzida por MCT foi documentado anteriormente por Brown et al. (1998), o qual observou uma "respiração rápida e superficial", além da ocorrência de um aumento das "dificuldades respiratórias". Estes autores correlacionaram estes achados com uma diminuição na densidade dos adrenoceptores-β2 nos pulmões desses animais. A estimulação destes receptores causa broncodilatação e aumenta a concentração de adenosina monofosfato em mastócitos e basófilos, reduzindo a liberação de mediadores inflamatórios (Oliveira et al., 1989). Assim, a diminuição desses receptores nos pulmões nesse modelo, poderia trazer implicações respiratórias importantes, uma vez que a broncoconstrição poderia diminuir o fluxo aéreo para os alvéolos pulmonares, promovendo um quadro de hipoxemia e/ou hipercapnia, que seria compensada reflexamente com uma elevação da FR, tal como a observada em nosso estudo, além de um maior esforço respiratório.

Um sistema de medida ventilatória utilizando pletismografia de corpo inteiro em ratos também foi utilizado por Gardner et al. (2004), o qual não observou aumentos das variáveis ventilatórias (FR, VC ou Vmin), contrastando com nossos resultados. Entretanto, esses ratos foram avaliados 10 dias após o tratamento com MCT, enquanto o tempo de tratamento dos nossos animais foi de 3 semanas, o que poderia ter contribuído para a instalação incompleta do quadro de HP, bem como dos achados subseqüentes.

Nossos resultados mostraram um aumento significativo na FR, no VC, e no Vmin no grupo MCT. Em conjunto com os achados gasométricos (hipoxemia), outras hipóteses poderiam ser consideradas para explicar estes achados: a) estreitamento progressivo e destruição dos vasos pulmonares, b) ativação dos quimiorreceptores periféricos em decorrência da hipoxemia e c) elevação dos níveis de serotonina plasmática.

Em relação a primeira hipótese, o estreitamento dos vasos pulmonares pela MCT promove uma diminuição da área transversa do leito vascular pulmonar, e consequentemente, um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo. Além disso, a destruição da vasculatura pulmonar promove menor área de trocas gasosas, o que levaria o animal a compensar estas perdas estruturais aumentando a FR e o VC, para tentar reverter um quadro de hipoxemia.

Por outro lado, a ativação dos quimiorreceptores periféricos, um dos mais importantes mecanismos reflexos que promove ajustes cárdio-respiratórios, deve ser considerada e será discutida posteriormente em detalhes. A hipoxemia constitui um dos principais estímulos para a ativação destes quimiorreceptores, os quais promovem um importante aumento da FR, assim como do volume corrente (Marshall et al., 2000; Haibara et al., 2002).

Em relação a serotonina [5-Hidroxitriptamina (5-HT)], este neurotransmissor tem sido envolvido na patogênese da HP. Comparados com indivíduos controle, pacientes com HP apresentam um aumento na concentração plasmática de 5-HT e diminuição de suas concentrações plaquetárias. Níveis plasmáticos de 5-HT também estão elevados em pacientes com HP induzida por fenfluramine (anorexígeno) (Newman et al., 2004).

Sabe-se que a serotonina é um potente constritor das artérias pulmonares, e a sua liberação nos pulmões ou a inibição da recaptação de substâncias vasoativas, é provavelmente o principal fator na constrição dos vasos pulmonares associados com ventilação hipóxica, edema pulmonar e embolismo pulmonar (Houston e Vanhoutte, 1986). Sob condições normais, o leito vascular pulmonar não é exposto às serotoninas plasmáticas excessivas, devido à habilidade das plaquetas em armazenar grandes quantidades de serotonina, e porque a serotonina plasmática é rapidamente metabolizada pela monoamina oxidase endotelial no fígado e pulmões (Hart e Block, 1989). Dessa forma, concentrações plasmáticas aumentadas de serotonina na HP poderia

potencializar os efeitos da MCT, promover um aumento da resistência das arteríolas pulmonares e diminuição do fluxo sangüíneo, acarretando hipoxemia e, reflexamente, aumentar a FR.

Estudos recentes têm enfatizado o papel da serotonina no processo do remodelamento vascular pulmonar, entretanto, o mecanismo pelo qual a 5-HT afeta a vasculatura pulmonar é ainda tema de debate. Embora tenha sido demonstrado previamente que a superexpressão do transportador da 5-HT (5-HTT) tenha sido associada com hiperplasia de músculo liso vascular pulmonar em pacientes com HP (Eddahibi et al., 2001), estudos em modelos animais evidenciam que não somente o 5-HTT, mas também vários tipos de receptores 5-HT (5-HTT_{1B}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}), podem contribuir para o processo de remodelamento vascular (Keegan et al. 2001; Launay et al., 2002).

5.0 – Gasometria

Em relação aos valores gasométricos, observamos neste estudo uma importante diminuição da PaO_2 e da Saturação da Hb nos animais do grupo MCT, o que caracteriza um quadro de hipoxemia. Este quadro também foi documentado anteriormente por Lai et al. (1991) e Schermuly et al. (2005) que encontraram diminuição na PaO_2 em ratos com HP induzida por MCT. Sabe-se que a exposição prolongada à hipóxia alveolar está associada com estreitamento do lúmen da vasculatura pulmonar devido ao crescimento de células do músculo liso, o qual pode ser evidenciado pelo espessamento da camada média das arteríolas (Farber e Loscalzo, 2004). A hipertrofia da camada média arteriolar, ao aumentar a resistência das artérias pulmonares, poderia estar levando a um prejuízo na oxigenação do sangue, uma vez que a entrada de O_2 ao nível capilar estaria reduzida devido a diminuição do fluxo sangüíneo, levando dessa forma à hipoxemia encontrada nesses animais.

Um aspecto importante a ser salientado refere-se aos efeitos da hipoxemia crônica sobre as artérias e arteríolas pulmonares. Tem sido sugerido que a hipoxemia promove a constrição destes vasos através de um mecanismo que se inicia pela inibição de vários canais de potássio (K^+), seguida de despolarização da membrana celular e entrada de cálcio através dos canais do tipo L (Ward et al., 2004). Essa é uma resposta diferenciada para a vasculatura pulmonar, se considerarmos que perifericamente, a hipóxia crônica promove uma resposta vasodilatadora (Ward et al., 2004). Dessa forma, esta vasoconstrição pulmonar mediada pela hipóxia, poderia ser um fator que, somado ao

espessamento da camada média arteriolar, estaria contribuindo para o aumento da resistência pulmonar nesse modelo de HP induzida por MCT. Não poderia ser descartada a possiblidade deste fator também estar potencializando o quadro de hipoxemia dos animais MCT.

O fato de não termos encontrado alterações na PaCO₂, pH e HCO_3^- , poderia refletir uma maior capacidade do animal em promover o ajuste desses parâmetros gasométricos, seja pela participação dos mecanismos desencadeados pelos quimiorreceptores periféricos ou centrais, ou pelas próprias características físicas do CO_2 , uma vez que este apresenta um coeficiente de difusão superior ao O_2 nas membranas biológicas.

6.0 - Pressões ventriculares

Também foram avaliadas neste estudo as pressões desenvolvidas pelos ventrículos direito e esquerdo dos animais tratados com MCT e salina. Nossos resultados mostraram um aumento significativo nos valores pressóricos da câmara ventricular direita dos animais tratados com MCT quando comparados ao grupo salina. Estes resultados estão em acordo com os achados clínicos da HP e com vários estudos da literatura científica envolvendo a HP induzida por MCT. O aumento na pressão sistólica corrobora os resultados de outros estudos de metodologia semelhante (Morita et al., 1996; Prié et al., 1998; Jasmin et al., 2001; Inoue et al., 2002; Nagaya et al., 2003; Lee et al., 2005; Schermuly et al., 2005), assim como o aumento da pressão diastólica final (Chen et al., 2001; Jasmin et al., 2001).

Kato et al. (2003) avaliaram a hipertrofia ventricular direita em ratos tratados com MCT por meio de ecocardiografia (Doppler pulsado) e observaram um aumento significativo das pressões de câmara cardíaca direita no grupo MCT. Por outro lado, não observaram diferenças significativas em relação às pressões desenvolvidas pelo ventrículo esquerdo. Apesar dessa técnica ser não-invasiva, ela se assemelha aos achados realizados via cateterismo cardíaco, observados em nosso estudo.

Estudos anteriores de Werchan et al. (1989) mostraram elevações significativas no desenvolvimento, i*n vitro,* das dP/dT positiva e negativa em ratos tratados com MCT, sugerindo que ambas as taxas, isto é, de desenvolvimento de pressão e de relaxamento, respectivamente, encontram-se aumentadas.

Também demonstraram que a hipertrofia de VD, causada pelo aumento de pós-carga cardíaca induzida pela MCT, resultou em um aumento no desempenho ventricular, sem evidência de insuficiência cardíaca (hipertrofia fisiológica).

O fato de encontrarmos um aumento em todas as pressões de VD, bem como da [dP/dT(+)] e [dP/dT(-)] em nosso estudo, confirmam a instalação da HP nesse modelo, demonstrando dessa forma, a maior força contrátil necessária para vencer a resistência imposta pelo estreitamento dos vasos pulmonares (pós-carga), e justificando assim a ocorrência de hipertrofia de VD nos animais.

7.0 - Reflexos cardiovasculares

7.1 - Avaliação do barorreflexo em ratos submetidos à HP experimental

O barorreflexo é um importante mecanismo neural regulador da PA, atuando batimento-a-batimento no intuito de impedir alterações bruscas. No presente estudo, observamos uma significativa diminuição na sensibilidade (ganho) barorreflexo em animais tratados com MCT.

O estudo da função barorreflexa tem despertado o interesse dos pesquisadores por várias décadas. A correlação entre a disfunção barorreflexa e doenças cardiovasculares é um dos aspectos mais estudados. Sabe-se que a redução na sensibilidade dos barorreceptores é um fator de risco independente para a morte súbita que se segue ao infarto agudo do miocárdio (Fei et al., 1994). Também está muito bem estabelecido que tanto animais como pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica apresentam atenuação importante na sensibilidade do reflexo barorreceptor, e esta diminuição poderia contribuir para um aumento de lesões em órgãos-alvos e reações adversas (McCubbin et al., 1956, *apud* Haibara e Santos, 2001; Eckberg et al., 1979; Grassi e Mancia, 1994).

Vários estudos na literatura têm demonstrado um prejuízo do funcionamento barorreflexo em animais portadores de hipertrofia cardíaca esquerda (Creager e Creager, 1994; Malpas et al., 1997; Mortara et al., 1997; Vasquez et al., 1997). A hipertrofia miocárdica esquerda e a função barorreflexa foram estudadas anteriormente por Meyrelles et al. (1998) e demonstrou-se que ratos submetidos ao tratamento crônico com isoproterenol, apresentaram hipertrofia miocárdica esquerda sem alteração de PAM e FC, porém, com diminuição do ganho barorreflexo. A despeito deste e de outros trabalhos, pouca ênfase tem sido dada a função barorreflexa em animais com hipertrofia cardíaca direita.

A atenuação da resposta barorreflexa encontrada em nosso estudo, poderia significar um fator de risco para as doenças cardíacas que envolvam aspectos relacionados à insuficiência cardíaca direita, *Cor pulmonale* ou HP. Não há estudos anteriores descritos na literatura sobre a diminuição do ganho barorreflexo em animais com HP por MCT. No entanto, alguns questionamentos a respeito da gênese desta disfunção barorreflexa permanecem por serem esclarecidos.

Uma hipótese para explicarmos a atenuação do ganho barorreflexo observado nos animais tratados com MCT seria a interação entre os reflexos cardiovasculares, tal como o baro- e o quimiorreflexo.

Fibras aferentes dos quimiorreceptores periféricos e dos barorreceptores arteriais terminam no núcleo do trato solitário (NTS), que constitui uma importante área bulbar integradora das informações sensoriais aferentes dos reflexos cardiovasculares. Tem sido sugerido que as aferências quimiorreceptoras poderiam alterar a função barorreflexa, ao nível central, assim como aferências barorreceptoras poderiam alterar a função quimiorreflexa (Henry et al., 1998).

A ativação do quimiorreflexo promove, além de respostas cardiovasculares e respiratórias, uma importante resposta comportamental (Franchini et al, 1999). Esta resposta é devido a ativação de um sistema hipotalâmico de defesa, o qual tem sido atribuída uma significativa relevância deste sistema sobre o controle respiratório e circulatório (para revisão ver Hilton, 1982). O grupo de reações comportamentais (reação de defesa) levam à inibição do barorreflexo. Em experimentos no qual a área hipotalâmica de defesa foi estimulada eletricamente, uma inibição da bradicardia e vasodilatação periférica evocada pelo

131

estímulo dos barorreceptores foi observada (Coote et al., 1979). Em outras palavras, o padrão de resposta de defesa predomina, e o barorreflexo é suprimido. Essa supressão é explicada, pelo menos em parte, por uma via do hipotálamo para o NTS, cujas sinapses ocorreriam próximo ao sítio onde as fibras aferentes barorreceptoras chegam no NTS (Spyer, 1994).

Os achados da ativação dos quimioreceptores suprimindo o componente de FC do barorreflexo também foram estudados por Marshall (1981) em gatos, onde a supressão foi observada somente quando o componente cardiovascular da reação de defesa estava completamente expressado. Este achado foi suportado posteriormente por Murata et al. (1999) em um estudo em ratos submetidos a hipóxia, com subseqüente inibição da resposta bradicárdica barorreflexa.

Assim, se considerarmos estes achados, podemos sugerir que a atenuação do barorreflexo encontrado em nosso estudo, poderia ser devido à ativação do quimiorreflexo, bem como da ocorrência de ativação das áreas de defesa, pela hipóxia crônica, acarretando uma inibição da expressão normal dos barorreceptores.

7.2 - Avaliação do reflexo Bezold-Jarisch em ratos submetidos à HP experimental

A participação dos receptores cardíacos na regulação cardiovascular tem sido estudada ao longo de todo o século passado. A inervação aferente do coração é composta por fibras mielinizadas e não-mielinizadas (Agostini et al., 1957 *apud* Hainsworth, 1991), as quais caminham junto aos nervos vago e simpático. As fibras aferentes vagais não-mielinizadas foram identificadas nos átrios por Coleridge et al. (1973), as quais podem ser estimuladas tanto química, quanto mecanicamente. Quimicamente, estas fibras podem ser estimuladas através da veratridina, capsaicina e fenilbiguanida, mas respondem também com elevações da pressão atrial. A inervação aferente dos ventrículos cardíacos, por sua vez, é principalmente, mas não totalmente, composta por fibras nervosas não-mielinizadas (Coleridge et al., 1964 *apud* Hainsworth, 1991; Thorén, 1980; Paintal, 1995). ANEXOS

Estudos prévios têm mostrado que os receptores ventriculares também podem ser excitados tanto quimicamente, como mecanicamente. As áreas ventriculares mecanosensoriais têm sido localizadas nas camadas mais profundas do ventrículo, muito embora alguns estudos tenham demonstrado que elas estão concentradas na superfície da camada epicardial ou endocardial (Coleridge et al., 1964, *apud* Hainsworth, 1991). Várias substâncias têm sido utilizadas para estimular quimicamente os receptores ventriculares. Substâncias como a fenilbiguanida, capsaicina, prostaglandina e bradicinina estimulam apenas fibras não-mielinizadas (Baker et al, 1979; Kaufman et al., 1980). Em ratos, a estimulação química com serotonina e fenilbiguanida promove respostas hipotensoras e bradicárdicas através da estimulação dos receptores 5-HT₃ (denominado Reflexo Bezold-Jarisch), os quais estariam principalmente localizados no átrio e ventrículo esquerdo (65%) (Donald e Shepherd, 1978; Ustinova e Schultz, 1994b; Chianca e Machado, 1994; Vasquez, 1997). O estudo do papel funcional dos Reflexos cardiopulmonares, tal como o reflexo Bezold-Jarisch em humanos e em animais, tem sido intensificado nas últimas décadas devido a sua importância nos mecanismos de regulação cardiovascular, juntamente com o Barorreflexo (Vasquez et al., 1997; Zanchetti e Mancia, 1991). A sua participação no controle da função circulatória tem sido observada tanto clínica, quanto experimentalmente. Em seres humanos, foi demonstrado que este reflexo está exacerbado em pacientes portadores de hipertensão arterial limítrofe (Zanchetti e Mancia, 1991; Mark e Kerber, 1982).

O estudo sobre a importância funcional dos receptores ventriculares direito cardíacos tem recebido muito menos atenção dos investigadores do que os receptores do ventrículo esquerdo. Em parte devido aos estudos histológicos que mostraram a existência de poucas fibras nervosas aferentes, embora hajam estudos que mostrem que, apesar de poucas em número, existam fibras tanto mielinizadas como não-mielinizadas que terminam no VD (Coleridge et al., 1964 *apud* Hainsworth, 1991; Paintal, 1995; Thorén, 1980).

As dificuldades metodológicas para se estudar os receptores do VD é um outro fator que deve ser considerado. Dois tipos de metodologias têm sido utilizadas: a distensão de um balão colocado no VD e alterações na pressão sanguínea.

Nos estudos onde foi utilizada a técnica de distensão de um balão, observou-se bradicardia e vasodilatação (Kostreva et al., 1979; Zelis et al., 1977). Entretanto, as altas pressões promovidas pela distensão do balão não permitiram que os resultados fossem conclusivos. Estudos posteriores de Crisp et al. (1988), utilizando pressão sistólica de VD controlada (16-39 mmHg), resultou em respostas não significantes de FC, PA e atividade respiratória, o que trouxe uma certa controvérsia ao papel dos receptores ventriculares no controle cardiovascular.

Por outro lado, a aplicação de capsaicina e bradicinina sobre a superfície epicárdica de gatos, promoveu aumentos significativos da descarga do nervo frênico, bradicardia e queda da PA, cujas respostas cardiovasculares foram similares àquelas observadas pela ativação do Reflexo Bezold-Jarisch (Waldrop e Mullins, 1987). Poderíamos sugerir que a avaliação deste reflexo em ratos submetidos à hipertrofia ventricular direita constitui um outro método para se avaliar o papel funcional destes receptores no controle cardiovascular.

Os estudos que envolvem modelos de hipertrofia miocárdica esquerda mostram prejuízo do reflexo Bezold-Jarisch à estimulação com serotonina e fenilbiguanida (Ferrari et al., 1984; Zanchetti et al., 1991; Meyrelles et al., 1997). Estes achados estão em acordo com outros estudos de Meyrelles et al. (1994), os quais mostraram que este reflexo está atenuado em ratos com hipertrofia cardíaca induzida por isoproterenol. Entretanto, não há estudos na literatura que tenham avaliado este reflexo em modelos de hipertrofia ventricular direita, tal como é observado em ratos tratados com MCT.

A avaliação do reflexo Bezold-Jarisch em ratos com hipertrofia ventricular direita por MCT do presente estudo mostrou que a resposta bradicárdica induzida pela fenilbiguanida apresentou-se exacerbada, enquanto os valores de hipotensão não foram significativamente diferentes do grupo controle.

Experimentalmente, o reflexo Bezold-Jarisch também se encontra bastante aumentado em ratos tratados com L-NAME, um inibidor da NO-Sintase (Araújo et al., 1998). Os mecanismos pelo qual este reflexo está exacerbado não são completamente esclarecidos. A hipótese de que haja uma hiperresponsividade cardíaca dos receptores colinérgicos tem sido considerada. Entretanto, esta hipótese não explicaria os achados do presente estudo, uma vez que a avaliação autonômica mostrou que o componente parassimpático está atenuado nos ratos tratados com MCT.

Uma hipótese para explicarmos esta exacerbação estaria relacionada aos estudos de Araújo et al. (1998), o qual já foi mencionado acima. Estes autores observaram uma exacerbação das respostas cardiovasculares do Reflexo Bezold-Jarisch em ratos tratados com L-NAME, sugerindo uma importante participação do NO (óxido nítrico) no controle reflexo cardiovascular. Por outro lado, uma alteração da liberação de substâncias vasoconstritoras e

vasodilatadoras pelo endotélio pulmonar em condições hipóxicas crônicas têm sido discutidas na literatura (Shimoda et al., 2000). Em relação às substâncias vasodilatadoras, tem sido observada uma diminuição da secreção de NO em modelos de HP induzida por MCT (Prié et al., 1998; Mathew et al., 1997). Assim, se considerarmos estes achados e os resultados de Araújo et al., (1998), podemos sugerir que a exacerbação da resposta bradicárdica do reflexo Bezold-Jarisch seria devido a uma menor secreção de NO nos ratos tratados com MCT, ou seja, portadores de HP. De qualquer modo, estudos adicionais são necessários para se avaliar esta hipótese, assim como uma possível alteração na transdução do sinal ao nível do receptor cardíaco. Diante destas hipóteses, um fato importante que deve ser destacado refere-se a importante participação dos receptores do VD nos mecanismos de regulação cardiovascular.

7.3 - Avaliação do quimiorreflexo em ratos submetidos à hipertensão pulmonar experimental

Os quimiorreceptores arteriais respondem a aumentos ou quedas de PaO₂, PaCO₂ e/ou pH, desencadeando respostas homeostáticas do sistema cárdio-respiratório para corrigir essas variações. Quedas na PaO₂, aumentos na PaCO₂ e queda no pH, promovem respostas reflexas caracterizadas por aumento da resistência periférica e alterações na FC (Marshall et al., 2000).

Alguns estudos têm relatado que o quimiorreflexo induzido pela hipóxia está exacerbado em animais SHR (spontaneous hypertensive rats) e na hipertensão humana (Trzebsky, 1992; Trzebsky et al., 1982). Entretanto, o estudo das respostas quimiorreflexas ainda não havia sido investigado em modelo de animais com HP induzida por MCT.

Nosso estudo demonstrou uma atenuação importante nas respostas cardiovasculares quimiorreflexas (hipertensão e bradicardia) nos ratos tratados com MCT. Dentre os achados deste estudo que se relacionam diretamente com os quimiorreceptores periféricos, a hipoxemia crônica é um dos resultados mais importantes. Esta hipoxemia promove a ativação dos quimiorreceptores, o qual desempenha um papel vital para a sobrevivência do animal. Observamos que os animais tratados com MCT e submetidos à remoção dos quimiorreceptores periféricos morreram poucas horas após o término da cirurgia, e, os poucos sobreviventes, apresentaram-se prostrados e com sérias dificuldades respiratórias (dados não incluídos). O quimiorreflexo promove tanto ajustes cardiovasculares, como respiratórios. Em relação aos primeiros, promove aumento da atividade eferente simpática, acarretando elevação na resistência vascular periférica e, consequentemente, aumento da PAM. Isto poderia explicar o aumento da atividade do componente simpático após o bloqueio autonômico neste estudo.

Em relação aos parâmetros respiratórios, a ativação do quimiorreflexo promove aumento da FR e do VC, respostas que também foram observadas neste estudo e que sugere ser mediada por este reflexo. Observamos ainda que o quimiorreflexo foi eficaz em manter os valores de PaCO₂ (normocapnia), mas não da PaO₂ (hipoxemia). Em primeiro lugar, deve ser considerado o fato do CO₂ apresentar uma maior facilidade em atravessar as membranas biológicas que o O₂. Em segundo lugar, como já descrito anteriormente, a hipoxemia crônica observada poderia ser decorrente da própria hipertrofia da camada média das arteríolas pulmonares, porém, poderia ser decorrente também de uma maior liberação de substâncias vasoconstritoras derivadas do endotélio pulmonar, bem como de uma menor liberação de substâncias vasodilatadoras (Shimoda et al., 2000), o que diminuiria o fluxo sanguíneo para o leito vascular pulmonar, retroalimentando positivamente o quadro de hipoxemia.

Neste estudo, a ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos tratados com MCT promoveu respostas hipertensoras e bradicárdicas atenuadas. Uma hipótese para explicar estas atenuações seria o fato dos quimiorreceptores estarem em um nível de excitação mais elevado devido ao quadro de hipoxemia, e mais próximo de um nível máximo de excitação ou saturação. Assim, uma ativação adicional pelo KCN já estaria próximo deste limite máximo, promovendo respostas cardiovasculares atenuadas.

Uma outra hipótese estaria relacionada com o aumento da FR basal nos ratos tratados com MCT, o que promoveria um efeito vagolítico e consequentemente uma menor bradicardia ao KCN. Em relação à atenuação da resposta pressora, não pode ser descartado o fato da hipoxemia promover a liberação de fatores vasodilatadores para aumentar o fluxo sanguíneo para atender as necessidades teciduais, o que se oporia, de certa forma, ao aumento da resistência periférica mediada pelo componente simpático quimiorreflexo, causando assim a atenuação desta resposta. Nossos resultados não permitem evidenciar o mecanismo de ação, havendo, portanto, a necessidade de experimentos adicionais.

8.0 - Avaliação autonômica

A disfunção autonômica se refere àquela condição na qual a função autonômica se altera de forma a afetar adversamente a saúde. A avaliação da atividade do SNA pelo uso de diferentes técnicas de medida, tem permitido estimar a contribuição desse sistema nas respostas alteradas associadas à doença cardiovascular. Inúmeras evidências apontam para a hiperatividade simpática na fisiopatologia da hipertensão arterial e da insuficiência cardíaca (Lanfranchi et al., 2002). A insuficiência cardíaca congestiva (ICC), por exemplo, está associada com um aumento da atividade do nervo simpático e uma redução da atividade do nervo parassimpático (Nihei et al, 2005), e esse desequilíbrio autonômico pode aumentar o risco de morte súbita em pacientes com

ICC (DeFerrari et al, 1993). A diminuição na variabilidade da FC e o prejuízo na sensibilidade barorreflexa têm sido descritos mesmo nas fases iniciais de disfunção ventricular, sendo o prejuízo na função barorreflexa um mecanismo que explica a alta ativação simpática na Insuficiência cardíaca (Lanfranchi et al., 2002). O mecanismo responsável pela hiperatividade simpática na insuficiência cardíaca permanece desconhecido (Middlekauff, 1997) e pode estar relacionado a diversos sistemas, tais como: atenuação da sensibilidade dos mecanorreceptores arteriais e cardíacos; alteração pressórica na artéria e no capilar pulmonar; exacerbação do quimiorreflexo periférico e central; ativação das aferências simpáticas cardíacas e ativação do sistema renina-angiotensina, entre outros (Irigoyen et al., 2004).

Em nosso estudo, encontramos marcada ativação simpática e diminuição na atividade parassimpática do grupo MCT comparado ao grupo salina. Estudos de Nihei et al (2005) em ratos com ICC induzida por MCT corroboram nossos achados em relação a atenuação do componente parassimpático.

Os efeitos dos bloqueios autonômicos com atropina (antagonista dos receptores muscarínicos) e propanolol (antagonista β-adrenérgico não-seletivo) também foram avaliados por Sanyal et al. (2002) em ratos tratados com MCT. Estas drogas foram injetadas de forma intra-peritoneal, com registro eletrocardiográfico telemétrico 30 minutos antes e 30 minutos após injeção. Após administração de atropina, o aumento na variabilidade da FC foi menor no grupo MCT em relação ao controle, indicando uma diminuição na função do controle parassimpático, dados estes em acordo com os nossos estudos. Entretanto, após administração do propanolol, a diminuição na variabilidade da FC foi similar entre os grupos, indicando a preservação da atividade simpática. Esses dados não estão de acordo com nosso estudo, que demonstrou um aumento na atividade simpática no grupo MCT em relação ao controle. Essa diferença encontrada pode ser explicada pela diferente forma de administração dos bloqueadores, bem como pelos diferentes níveis basais de FC entre os estudos.

9.0 - PESO ÚMIDO E SECO DE CORAÇÃO, PULMÃO E FÍGADO

9.1 – Peso de Câmaras cardíacas

A hipertrofia de VD na HP induzida por MCT tem sido documentada exaustivamente por vários autores (Schultze et al., 1993; Morita et al., 1996; Jasmin et al., 2001; Inoue et al., 2002; Nagaya et al., 2003, Lee et al., 2005; Nihei et al, 2005; Schermuly et al., 2005). Nossos resultados relativos ao peso das câmaras cardíacas estão em acordo com esses resultados. Em nosso estudo, foi possível observar hipertrofia ventricular direita, e o fato deste aumento persistir mesmo após a desidratação das câmaras cardíacas, sugere que este aumento possa ser devido ao aumento da massa muscular cardíaca, e não por um possível acúmulo de líguidos no espaco intersticial (edema).

A hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo à sobrecarga de pressão ventricular, e desenvolve-se gradualmente por semanas, podendo conduzir à insuficiência cardíaca. A principal vantagem desse modelo de HP induzida por MCT, é a facilidade em se obter hipertrofia cardíaca direita, sem alterações no ventrículo esquerdo, e a garantia da sobrevivência dos animais até o dia do experimento. Dessa forma, estudos visando aspectos relacionados não somente à HP, mas também ao *Cor Pulmonale,* são facilmente obtidos, permitindo assim a obtenção de respostas acerca da hipertrofia ventricular direita.

9.2 – Peso de pulmão

O aumento no peso úmido e seco dos pulmões encontrado em nosso estudo corrobora outras pesquisas (Schultze et al., 1993; Brown et al., 1998; Ito et al., 2000; Inoue et al., 2002; Nihei et al, 2005) e demonstra que mesmo após a pesagem do pulmão após desidratação, o grupo MCT continuou mantendo valores maiores do que o grupo salina, sugerindo dessa forma que o aumento no peso pulmonar se deva a alterações estruturais do mesmo (remodelamento vascular). Estudos anteriores demonstraram que o remodelamento vascular é acompanhado por edema perivascular, fibrina, trombose plaquetária da microvasculatura pulmonar, hipertrofia e hiperplasia de células endoteliais (Valdivia et al., 1967a,b). Com o agravamento do quadro, as lesões pioram podendo ocorrer neo-muscularização de arteríolas previamente não-muscularizadas (Meyrick e Reid, 1982).

Quando administrada subcutaneamente em ratos, a MCT causa lesão vascular pulmonar, resultando em aumento persistente da permeabilidade dos microvasos e HP. Outros achados incluem aumento nas células intersticiais (Bruner et al., 1983), hipertrofia da camada média do músculo liso vascular

(Meyrick e Reid, 1980; Suylen et al, 1998) bem como edema intersticial, hemorragia, fibrose e infiltrado inflamatório alveolar (Stenmark et al., 1985; Wilson et al., 1989). Provavelmente, esses achados supracitados possam ser fatores que contribuem para o aumento de peso nos pulmões dos ratos tratados com MCT observados tanto na literatura como no presente estudo, entretanto, uma análise histológica mais apurada se faz necessária para a confirmação dessa hipótese.

9.3 – Peso de fígado

Poucos estudos em literatura têm evidenciado o peso do fígado em ratos tratados com MCT. No presente estudo, não encontramos alteração entre os grupos, no peso úmido e seco de fígado, resultados estes que corroboram o estudo de Brown et al. (1998).

Após administração subcutânea, a MCT é metabolizada no fígado, e posteriormente seus metabólitos são acumulados e possivelmente estabilizados por hemoglobinas durante o transporte ao leito vascular pulmonar por um mecanismo ainda não completamente caracterizado (Taylor et al., 1997). Uma vez no fígado, a MCT leva a necrose hepatocelular, fibrose panlobular, e doença veno-oclusiva (Jago, 1970; McLean, 1970) o que poderia, de certa forma, contribuir para explicar os achados do presente estudo. Entretanto, mais pesquisas se fazem necessárias para elucidar esse mecanismo de metabolização hepática e conseqüentes danos no órgão.

CONCLUSÃO

Avaliação Anátomo-Patológica

- Os animais tratados com MCT apresentaram um menor ganho de peso corporal em relação ao grupo salina.
- Análise do peso dos órgãos evidenciou um aumento do peso úmido e seco do ventrículo direito e pulmões no grupo MCT em relação ao grupo salina.

 A análise anátomo-patológica das arteríolas mostrou hipertrofia da camada média arteriolar nos animais tratados com MCT em relação ao grupo salina.

Avaliação Respiratória

- A gasometria dos animais tratados com MCT mostrou diminuição da PaO₂ e da Sat Hb nos animais tratados com MCT em relação ao grupo salina.
- O registro ventilatório evidenciou aumento da FR, VC e Vmin nos ratos tratados com MCT em relação ao grupo salina.

Avaliação Cardiovascular

- Os animais tratados com MCT apresentaram taquicardia sinusal, hipertrofia ventricular direita, bem como aumento nas pressões ventriculares da câmara cardíaca direita.
- A avaliação do barorreflexo mostrou uma atenuação significativa da sensibilidade (ganho) nos animais tratados com MCT quando comparados aos animais do grupo salina.
- A avaliação do reflexo Bezold-Jarisch mostrou uma exacerbação significativa na resposta bradicárdica induzida pela injeção de fenilbiguanida nas doses de 6 e 12 µg/kg no grupo MCT em relação ao grupo salina.
- Em relação ao quimiorreflexo, as injeções de KCN nos animais tratados com MCT promoveram uma atenuação da resposta bradicárdica e da resposta pressora nas doses de 20 e 40 µg/kg em relação ao grupo salina.
- Os animais tratados com MCT apresentaram um aumento da atividade simpática e uma redução na atividade parassimpática em relação ao grupo salina.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com MCT desenvolve um quadro de Hipertensão Pulmonar, acompanhado de uma série de alterações cardiovasculares e respiratórias importantes. Em relação às variáveis cardiovasculares, uma taquicardia foi observada e o aumento das pressões da câmara direita corroboram a instalação de uma hipertrofia de ventrículo direito. Os mecanismos cardiovasculares reflexos são afetados de forma diferente neste modelo, isto é, observamos uma diminuição significativa no ganho barorreflexo e atenuação das respostas quimiorreflexas, enquanto que a resposta bradicárdica do reflexo Bezold-Jarisch foi exacerbada. A disfunção autonômica encontrada, caracterizada por um aumento da atividade simpática e atenuação da atividade parassimpática, tem um importante contexto clínico, uma vez que tais achados contribuem como um fator de risco aumentado para o infarto miocárdico e a morte súbita. O quadro de hipoxemia observado, acompanhado de alterações ventilatórias caracterizadas por taquipnéia e aumento de volume corrente, sugerem a ativação de mecanismos compensatórios para atenuar este quadro. As alterações acima, juntamente com os achados de espessamento da camada média das arteríolas pulmonares e suas repercussões sobre o aumento da resistência pulmonar ao fluxo sanguíneo, constituem um importante modelo para o estudo da Hipertensão Pulmonar e do *Cor Pulmonale*. Deve ser ressaltado ainda, que os fatores alterados aqui observados resguardam uma grande similaridade com a clínica da Hipertensão Pulmonar, o que confere a este modelo uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD FM & THAMES MD. Interaction of cardiovascular reflexes in circulatory control. In: The Handbook of Physiology – The Cardiovascular System III, 19: 675-753, 1979.

AHERNE WA. Morphometry. London: Edward Arnold, 205p., cap. 12, p. 155; 1982.

- AMARAL FT. Estudo da neurotransmissão da área bulbar ventral e da substância cinzenta periaquedutal dorsolateral sobre o componente simpatoexcitatório do quimiorreflexo em ratos não-anestesiados. Tese de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil, 1999.
- AMARAL FT. Participação das estruturas bulbares e suprabulbares na gênese da resposta simpato-excitatória do quimiorreflexo em ratos. Tese de doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil, 2004.
- ARAUJO MTM, BARKER LA, CABRAL AM, VASQUEZ EC. Inhibition of Nitric Oxide Synthase causes profound enhancement of the Bezold-Jarisch Reflex. *American Journal of Hypertension*, 11:66-72; 1998.
- AVIADO DM, AVIADO DG. The B-J reflex A historical perspective of cardiopulmonar reflexes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 940:48-58, 2001.
- BAKER DG, COLERIDGE HM, COLERIDGE CG. Vagal afferent C fibres from the ventricle. In: Cardicac Receptors, edited by R. Hainsworth, C. Kidd, and R.J. Linden. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press, p. 117-137, 1979.
- BARRETO AC, FRANCHI SM, PEREIRA AC, LOPES AA. Hipertensão arterial pulmonar. Fisiopatologia, aspectos genéticos e resposta ao uso crônico do sildenafil. Arg Bras Cardiol 85, 2: 147-153; 2005.

BARTLETT DJR. Origin and regulation of spontaneous deep breaths. Resp Physiol; 12:230-238; 1971.

BISCOE TJ and DUCHEN MR. Monitoring PO₂ by the carotid chemoreceptor. News Physiol Sci 5: 229-237, 1990.

BROWN AM. Receptors under pressures. Circ Res, 46:1-10, 1980.

- BROWN L, JASON M, ANDREW D, CONRAD S. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31 (1) 108-115; Jan 1998.
- BRUNER LH, HILLIKER KS, and ROTH RA. Pulmonary hypertension and ECG changes from monocrotaline pyrroles in the rat. *Am J Physiol*, 245, H300-H-306, 1983.
- CHEN L, LEE J-S, KIM KL, SUH YL, JEON E-S, KIM D-K. Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotalineinduced pulmonary vascular injury by the Na⁺ - H⁺ exchange inhibitor cariporide. *JPET* 298 (2) 469-476, 2001.
- CHIANCA DJ, MACHADO BH. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. *Brasilian J Med Biol Res* 27: 775-781; 1994.
- COLERIDGE HM, COLERIDGE JCG, DANGEL A, KIDD C, LUCK JC, SLEIGHT P. Impulses in slowly conducting vagal fibres from afferent endings in the veins, atria, and arteries of dogs and cats. *Circ Res* 33: 87-97, 1973.
- COOTE JH, HILTON SM & PEREZ-GONZALEZ JF. Inhibition of the baroreceptor reflex on stimulation in the brain stem defence centre. Journal of Physiology, 288: 549-560; 1979.
- CREAGER MA, CREAGER SJ. Arterial baroreflex regulation of blood pressures in patients with congestive heart failure. *J Am Col Cardiol.* 23 (2): 401-405; 1994.
- CRISP AJ, HAINSWORTH R, TUTT SM. The absence of cardiovascular and respiratory responses to changes in right ventricular pressure in anaesthetized dogs. *J Physiol Lond* 407: 1-13; 1988.

- DALY BM, HAZZLDINE JL, HOWE A. Reflex respiratory and peripheral vascular responses to stimulation of the isolated perfused aortic arch chemoreceptors of the dog. J Physiol 177:300-22; 1965.
- D'ALONZO GE, BARST RJ, AYRES SM, BERGOFSKY EH, BRUNDAGE BH, DETRE KM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*, 115:343-9,1991.
- DeFERRARI GM, SALVATI P, GROSSONI M, UKMAR G, VAGA L, PATRONO C et al. Pharmacologic modulation of the autonomic nervous system in the prevention of sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 22: 283-290; 1993.
- DONALD DE, SHEPHERD JT. Reflexes from the heart and lungs: physiological curiosities or important regulatory mechanisms. *Cardiovascular Research* 12, 449-469, 1978.

DRAZEN JM, TAKEBAYASHI T, LONG NC, SHORE AS. Animal models of asthma and chronic bronchitis. Clin Exp Allergy, 29(S2): 37-47; 1999.

ECKBERG DL, DRABINSKY M, BRAUNWALD E. Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. N Engl J Med 285: 877-883; 1979.

EDDAHIBI S, HUMBERT M, FADEL E, RAFFESTIN B, DARMON M, CAPRON F, transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 108: 1141–1150; 2001.

FARBER HW, LOSCALZO J. Mechanisms of disease – Pulmonary Arterial Hypertension. N Engl J Med 351: 1655-1665, 2004.

FEI L, ANDERSON MH, KATRITSIS D, SNEDDON J, STATTERS DJ, MALIK M, CAMM AJ. Decreased heart rate variability in survivors of sudden cardiac death not associated with coronary artery disease. *British Heart J* 71: 16-21, 1994.

FEHRENBACH H. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks. Pathobiology. 70(5):277-83; 2003.
FERRARI A, GORDON FJ, MARK AL. Impairment of cardiopulmonary baroreflexes in Dahl salt-sensitive rats fed low salt. Am J Physiol; 247: H119-H123, 1984.

FRANCHINI KG, KRIEGER EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Autonom Nerv Syst.*, 42:63-70, 1999.

FRANCHINI KG, KRIEGER EM, OLIVEIRA VLL. Hemodynamics of chemoreflex activation in unanesthetized rats. Hypertension, 30:699-705, 1997.

- FRASCH HF, MARSHAL C, MARSHAL BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmomary hypertension. *Am J Physiol 276 (Lung Cell Mol, Physiol 20)*: L-304-L310, 1999.
- GARDNER SY, MCGEE JK, KODAVANTI UP, LEDBETTER A, EVERITT JI, WINSETT DW, DOERFLER DL, COSTA DL. Emission-particle-induced ventilatory abnormalities in a rat model of pulmonary hypertension. *Environ Health Perspect* 112 (8), 872:878, 2004.
- GILBEY MP & SPYER KM. Cardiorespiratory regulation. In: Neural Control of the Respiratory Muscles. Edited by A.D. Miller, A.L. Bianchi & B.P. Bishop, CRC Press, Inc., pp 259-269, 1997.
- GONZALEZ C, ALMARAZ L, OBESO A, RIGUAL R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends Neurosc.* 15:146-153, 1992.
- GRASSI G, MANCIA G. Arterial barorreflexes and other cardiovascular reflexes in hypertension. In: *Textbook of hypertension*. Swales JD (eds). Oxford, Blackwell Sci. Pub., 397-408, 1994.
- GUNDERSEN HJG, BOYSEN M & REITH A. A comparison of semiautomatic digitIzer tablet and simple point counting performance in morphometry. *Virchows Arch Cell Pathol*, 37:317-325, 1981.

HAIBARA AS, COLOMBARI E, CHIANCA JrDA, BONAGAMBA LGH, MACHADO BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol* 269 (*Heart Circ Physiol* 38) H1421-H1427, 1995.

HAIBARA AS, CAMPAGNOLE-SANTOS, MJ. Reflexos Cardiovasculares e hipertensão arterial. Rev Bras Hipertens 8: 30-40, 2001.

HAIBARA AS, TAMASHIRO E, OLIVAN MV, BONAGAMBA LG, MACHADO BH. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Auton Neurosci* 101 (1-2): 60-67, 2002.

HAINSWORTH R. Reflexes from the heart. *Physiological Reviews* 71 (3): 617-657; 1991.

HART CM, BLOCK ER. Lung serotonin metabolism. Clin Chest Med 10:59-70; 1989.

HEAD GA, McCARTY R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J* Autonom Nerv Syst., 21:203-213, 1987.

HENRY RA, LU I-Li, BEIGHTOL LA, ECKBERG DL. Interactions between CO2 chemoreflexes and arterial baroreflexes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274: H2177-2187; 1998.

HILTON SM. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. J Exp Biol 100, 159-174; 1982.

HOUSTON DS, VANHOUTTE PM. Serotonin and the vascular system: Role in health and disease, and implications for therapy. Drugs 31:149-63; 1986.

HOWARD CV, REED MG. Unbiased stereology. Abingdon, Oxon, UK & New York: Garland Science / BIOS Science Publishers, 277 p., 2005.

INOUE H, YANO K, NOTO T, TAKAGI M, IKEO T, KIKKAWA K. Acute and chronic effects of T-1032, a novel selective phoshodiesterase type 5 inhibitor, on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Biol Pharm Bull*, 25 (11):1422-1426; 2002.

IRIGOYEN MC, SANTOS MSB, ANGELIS K. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. Rev Soc Card Rio Grande do Sul, 03: 1-7; 2004.

ITO KM, SATO M, USHIJIMA K, NAKAI M, ITO K. Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1786-H1795, 2000.

JACOB HJ, ALPER RH, BRODY MJ. Peripheral mechanisms regulating arterial pressure lability in rats. *Fed Proc*, 45(4):876, 1986.

JACOB HJ, BARRES CP, MACHADO BH, BRODY MJ. Studies on neural and humoral contributions to arterial pressure lability. *Am J Med Sci*, 295:341-345,1988.

JAGO MV. A method for the assessment of the chronic hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Aust J Exp Biol Med Sci* 48, 93-103; 1970. JASMIN JF, LUCAS M, CERNACEK P, DUPUIS J. Effectiveness of a nonselective ET_{A/B} and a selective ET_A antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Circulation, 103:314-318; 2001.

JASMIN JF, CERNACEK P, DUPUIS J. Activation of the right ventricular endothelin (ET) system in the monocrotaline model of pulmonary hypertension: response to chronic ETA receptor blockade. *Clinical Science* 105, 647-653, 2003.

JORDAN D & SPYER KM. Brainstem integration of cardiovascular and pulmonary afferent activity. In: *Progress in Brain Research*. Edited by F. Cervero & J.F.B. Morrison, Elsevier Sciences Publishers B.V. pp295-314, 1986.

- KATO Y, IWASE M, KANAZAWA H, KAWATA N, NISHIZAWA T, NISHIMURA M, YOKOTA M. Progressive development of pulmonary hypertension leading to right ventricular hypertrophy assess by echocardiography in rats. *Exp Anim* 52(4): 285-294, 2003.
- KAPPAGODA CT, LINDEN RJ, SNOW HM. The effect of stretching the superior vena cava-right atrial junction on right atrial receptors in the dog. *J Physiol*; 227:875-887, 1972.
- KAUFMAN MP, BAKER DG, COLERIDGE HM. Stimulation by bradykinin of afferent vagal C-fibers with chemosensitive endings in the heart and aorta of the dog. *Circ Res* 46: 476-484, 1980.
- KEEGAN A, MORECROFT I, SMILLIE D, HICKS MN, MACLEAN MR. Contribution of the 5-HT1B receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT1B-receptor knockout mice and the 5- HT1B/1D-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* 89:1231–1239; 2001.

KLINGER JR, HILL NS. Right ventricular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: evaluation and management. Chest 99:715-723, 1991.

- KOSTREVA DR, HOPP FA, SUPERKU EJ, KAMPINE JP. Apnea, tachypnea, and hypotension elicited by cardiac vagal afferents. *J Appl Physiol* 47(2): 312-318; 1979.
- LAFRANCONI WM, HUXTABLE RJ. Hepatic metabolism and pulmonary toxicity of monocrotaline using isolated perfused liver and lung. *Biochem Pharmacol* 33:2479-2484, 1984.
- LAI YL, OLSON JW, GILLESPIE MN. Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol* 70:561-566; 1991.
 - LANFRANCHI A, SOMERS VK. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: 815 826, 2002.

LARUMBE MTC, ESCOBOZA JRB. Factores del sistema hemostático y funcion endothelial en la hypertension pulmonar primaria. *Rev Invest Clin* 46:421-5; 1994.

LAUNAY JM, HERVE P, PEOC'H K, TOURNOIS C, CALLEBERT J, NEBIGIL CG, ETIENNE N, DROUET L, HUMBERT M, SIMONNEAU G, MAROTEAUX L. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med.* 8:1129–1135; 2002.

LEE Y-S, BYUN J, KIM J-A, LEE J-S, KIM KL, SUH YL, JEON E-S, KIM D-K. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung. *Exp Mol Med* 37(1), 27-35, 2005.

LOPES OU & PALMER JF. Proposed respiratory 'gating' mechanism for cardiac slowing. *Nature*, 264: 454-456, 1976.

LÓPEZ-BARNEO J, BENOT AR, URENÃ J. Oxygen sensing and the electrophysiology of arterial chemoreceptor cells. New in Physiol Sci, 8:191-195, 1993.

LOSCALZO J – Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. N Engl J Med 327: 117-0; 1992.

LOUIE EK, LIN SS, REYNERTSON SL et al. Primary pulmonary hypertension, vasculature structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation* 92:819-24; 1995.

MALAN A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and poikilotherm. Respir Physiol 17:32-44; 1973.

MALPAS SC, GROOM AS, HEAD GA. Baroreflex control of heart rate and cardiac hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension in rabbits. *Hypertension*, 29(6): 1284-1290, 1997.

MARCH TH, GREEN FH, HAHN FF, NIKULA KJ. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease (Review). *Inhal Toxicol.* 12, Suppl 4:155-87, 2000.

MARK AL. The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. Am Coll Cardiol, 1:90-102, 1983.

MARK AL, MANCIA G. Cardiopulmonary baroreflexes in humans. Handbook of physiology. The cardiovascular system III, chapter 2:795-812, 1994.

- MARK MD, KERBER RE. Augmentation of cardiopulmonary baroreflex control of forearm vascular resistance in borderline hypertension. *Hypertension* 4(1): 39-46; 1982.
- MARSHALL JM. Interaction between the responses to stimulation of peripheral chemoreceptors and baroreceptors: the importance of chemoreceptor activation of the defence areas. *Journal of the Autonomic Nervous System* 3, 169- 186; 1981.
- MARSHALL HW, CLARKE JA, DALY JM, HENNESSY EM. Quantitative studies of the vasculature of the carotid body in the chronically hypoxic rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 331-340; 2000.
- MATHEW R, GLOSTER ES, SUNDARARAJAN T, THOMPSON CJ, ZEBALLOS GA, GEWITZ MH. Role of inhibition of nitric oxide production in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J appl Physiol* 82(5): 1493-1948, 1997.
- MATHIAS, SCB. Avaliação dos reflexos cardiovasculares em animais submetidos ao tratamento crônico com tiroxina. Tese de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil, 1999.
- MAUAD H, GLASS ML, MACHADO BH. Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability. *Hypertension* 19: 182-186, 1992.
- MAUAD H, MACHADO BH. Involvement of the ipsilateral rostral ventrolateral medulla in the pressor response to L-glutamate microinjection into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *J Autonom Nerv Syst* 74: 43-48, 1998.

MAUAD H, WAICHERT EJ. Modelo experimental para estudo das alterações cárdio-respiratórias observadas no *Cor Pulmonale*. Resumo (03.006) apresentado em anais - FeSBE 2004.

McLEAN EK. The toxic actions of pyrrolizidine alkaloids. Pharmacol Rev 22(4), 430-483; 1970.

MEYRELLES SS, CABRAL AM, VASQUEZ EC. Contribuição do reflexo cardiopulmonar na regulação cardiovascular. Arq Bras Cardiol 62(2): 123-130, 1994.

MEYRELLES SS, BERNARDES CF, MODOLO RP, MILL JG, VASQUEZ EC. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. *J Auton Nerv Syst.*, 63 (3): 144-152, 1997.

- MEYRELLES SS, MAUAD H, MATHIAS SCB, CABRAL AM, VASQUEZ EC. Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. *J Auton Nerv Syst* 73: 135-142, 1998.
- MEYRICK BO, REID LM. Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *Am J Pathol 106(1), 84-94,* 1982.
- MICHELINI LC. Mecanismos neuro-humorais na regulação reflexa da pressão arterial. *In: Hipertensão Arterial: Presente e Futuro*. Tavares LA, Lima EG, Vasquez EC. Fundo Editorial Bik, São Paulo 13-36, 1989.

MIDDLEKAUFF HR. Mechanisms and implications of autonomic nervous system dysfunction in heart failure. Curr Opin Cardiol 2:265-75; 1997.

MORITA K, OGAWA Y, TOBISE K. Effect of endothelium of pulmonary artery vasoreactivity in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Jap Circ Journ*, 60:585-591, 1996.

- MORTARA A, ROVERE MT, PINNA GD, MAESTRI R; FEBO O, POZZOLI M, OPASICH C, TAVAZZI L. Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure: clinical and hemodynamic correlates and prognostic implications. *Circulation*, 96 (10): 3450-3458; 1997.
- MURATA T, OTSU K, KOBAYASHI M, NOSAKA S. Inhibition of baroreflex vagal bradycardia by selective stimulation of arterial chemoreceptors in rats. *Exp. Physiol* 84, 897-906; 1999.
- NAGAYA N, OKUMURA H, UEMATSU M, SHIMIZU W, ONO F, SHIRAI M, MORI H, MIYATAKE K, KANGAWA K. Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2125-H2131, 2003.

NAUSER TD, STITES SW. Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Am Fam Physician* 63:1789-98, 2001.

- NEWMAN JH, FANBURG BL, ARCHER SL, et al. Pulmonary Arterial Hypertension Future Directions Report of a National Heart, Lung and Blood Institute/Office of Rare Diseases Workshop. *Circulation.* 109:2947-2952, 2004.
- NIHEI M, LEE JK, HONJO H, YASUI K, UZZAMAN M, KAMIYA K, OPTHOF T, KODAMA I. Decreased vagal control over heart rate in rats with right-sided congestive heart failure. *Circ J* 69:493-499, 2005.
- NIKULA KJ, GREEN FH. Animal models of chronic bronchitis and their relevance to studies of particle-induced disease (Review) .*Inhal Toxicol.* 12 Suppl 4:123-53, 2000.
- NOOTENS M, WOLFKIEL C, CHOMKA EV et al. Understanding right and left ventricular systolic function and interactions at rest and with exercise in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 75: 374-7, 1995.

OLIVEIRA ACC, CHIEIRA L, LOUREIRO C, VIEIRA I, LEITE CP, PEREIRA AC, MESQUITA I, PEREIRA C, GASPAR E. Beta adrenoreceptores e asma brônquica. *Revista Via Pneumológica*, 2 (2): 121-128; 1989.

PAINTAL AS. The study of ventricular pressure receptors and their role in the Bezold - Jarisch reflex. Q J Exp Physiol 40 348-363, 1995.

PEACOCK AJ. Pulmonary circulation. J Am Col Cardiol. 23 (2): 401-405; 2003.

PIRIS J, McINTYRE RLE. Length measurement by means of a grid. J Clin Pathol 34:519-523, 1981.

PRIÉ S, STEWART DJ, DUPUIS J. Endothelin – A receptor blockade improves nitric oxide-mediated vasodilation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 97:2169-2174, 1998.

REICHART E, BOERKMANN P, PLENAT F. Parenteral administration of trypsin triggers lung emphysema. Eur Respir J, 5 (7): 810-4, 1992.

RICH S. Primary pulmonary hypertension. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD et al – Princípios de Medicina Interna; 1211-4, 1995.

RICH S, MCLAUGHLIN VV, GENTHNER DE, PANELLA MM, HESS DM. Compassionate use of continuous prostacyclin in the management of secondary pulmonary hypertension: a case series. *Ann Intern Med*, 130:740-3, 1999.

RUBIN LJ, SIMONNEAU G, GALIE N ET AL. Clinical classification of pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol 43: 5S-12S; 2004.

SANYAL SN, ONO K. Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. Pathophysiology, 8 (3), 197-203, 2002.

SCHERMULY RT, KREISSELMEIER KP, GHOFRANI HA, SAMIDURAI A, PULLAMSETTI S, WEISSMANN N, SCHUDT C, ERMERT L, SEEGER W, GRIMMINGER F. Antiremodeling effects of lloprost and the Dual-selective Phopsphodiesterase 3/4 inhibitor Tolafentrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 172: 358-363, 2005.

SHEPHERD JT, MANCIA G. Reflex control of the human cardiovascular system. Rev Physiol Biochem Pharmacol 105:3-100, 1986.

SHIMODA LA, SHAM JSK, SYLVESTER JT. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. Physiol Rev 49: 549-560, 2000.

SCHULTZE AE, ROTH RA. Fibrinolytic activity in blood and lungs of rats treated with monocrotaline pyrrole. *Toxicol and Appl Pharm*, 121:129-137; 1993.

SPYER KM & GILBEY MP. Cariorespiratory interactions in heart-rate control. In: The Sudden Infant Death Syndrome: Cardiac and Respiratory Mechanisms and Interventions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 533: 350-357, 1988.

SPYER KM. The Central Nervous Organization of Reflex Circulatory control. In: *Central Regulation of autonomic Functions*. Edited by Loewy AD, Spyer KM, Oxford University Press, pp 168-188, 1990.

SPYER KM. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. Annual Review Prize Lecture. Journal of Physiology, 474: 1-19. 1994.

SPYER KM. Central nervous integration of cardiorespiratory control. In: Comprehensive Human Physiology. Edited by R. Greger & U.Windhorst, Springer-Veriag Berlin Heidelberg, Vol. 2, pp 2129-2144, 1996.

STENMARK KR, MORGANROTH ML, REMIGIO LK, VOELKEL NF, MURPHY RC, HENSON PM, MATHIAS MM, AND REEVES JT. Alveolar inflammation and arachidonate metabolism in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 248:H859–H866, 1985.

- SUGITA T, HYERS TM, DAUBER IM, WAGNER WW, MCMURTRY IF, REEVES JT. Lung vessel leak precedes right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol* 54:371-374, 1983.
- SUYLEN RJ, SMITS JF M, DAEMEN MJAP. Pulmonary Artery Remodeling Differs in Hypoxia- and Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1423–1428, 1998.

TAYLOR DW, WILSON DW, LAME MW, DUNSTON SD, JONES AD, SEGALL HJ. Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol and Appl Pharmacol* 143, 196-204, 1997.

THORÉN P. Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. Rev Physiol, Biochem Pharmacol, 86:1-94, 1980.

TRZEBSKY A, MALGORZATA T, ZOLTOWSKI M, PRZYBYLSKI J. Increased sensitivity of the arterial chemoreceptor drive in young men with mild hypertension. *Cardiovascular Research*, 16: 163-172; 1982.

TRZEBSKY A. Arterial chemoreceptor reflex and hypertension. *Hypertens Dall* 19:562-566, 1992.

USTINOVA EE, SCHULTZ HD. Activation of cardiac vagal afferents by oxygen-derived free radical in rats. Circ Res, 74:895-903, 1994a.

USTINOVA EE, SCHULTZ HD. Activation of cardiac vagal afferents in ischemia and reperfusion: Prostaglandins versus oxygen-derived free radicals. *Circ Res*, 74:904-911, 1994b.

VALDIVIA E, LALICH JJ, HAYASHI Y, SONNAD J. Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline. Arch Pathol 84, 64-76; 1967a.

VALDIVIA E, LALICH JJ, HAYASHI Y, SONNAD J. Experimental interstitial pulmonary edema. Angiology 18, 378-383; 1967b.

VAN SUYLEN RJ, SMITS JF, DAEMEN MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia – and monocrotaline induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1423-1428, 1997.

VASQUEZ EC, MEYRELLES SS, MAUAD H, CABRAL AM. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Braz J Med Biol Res* 30:521-532, 1997.
 VOELKEL N. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 133:1186-1195, 1986.

WALDROP TG, MULLINS DC. Cardiorespiratory responses to chemical activation of right ventricular receptors. J Appl Physiol. 63(2):733-9, 1987.

WEIR EK, ARCHER SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. FASEB J 9:183-189; 1995.

WEITZENBLUM E, EHRHART J, RASHOLINJANAHARY J, et al. Pulmonary hemodynamics in idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung disease. *Respir* 44:118-127; 1983.

WERCHAN PM, SUMMER WR, GERDES AM, McDONOUGH KH. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 256 (Heart Circ Physiol. 25): H1328-H1336, 1989.

WILSON DW, SEGALL HJ, PAN LCW, DUNSTON SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc. Res.* 38:57–80, 1989.

WILSON DW, SEGALL HJ, PAN LC, LAMÉ MW, ESTEP JE, MORIN D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol* 22 (5/6), 307-325, 1992.

YAN CC, HUXTABLE RJ. Quantitation of the hepatic release of metabolites of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Toxicol Appl Pharmacol* 127:58-63, 1996.

ZANCHETTI A, MANCIA G. Cardiovascular reflexes and hypertension. *Hypertension*, (Suppl. III): 13-21, 1991.

ZELIS RM, LOTYSCH M, BRAIS M, PENG CL, HURLEY E, MASON DT. Effect of isolated right and left ventricular stretch on regional arteriolar resistence. *Cardiovasc Res* 11: 419-426, 1977.

ZIN, W.A. Controle da ventilação. Em: Fisiologia, Ed.: Aires, M.M.Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 485-491, 1991.

ANEXO I

CLASSIFICAÇÃO DIAGNÓSTICA DA HIPERTENSÃO PULMONAR SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

Hipertensão Arterial Pulmonar

Hipertensão pulmonar primária Desordens esporádicas Desordens familiares Condições relacionadas Colagenoses Shunts congênitos sistêmicopulmonares Hipertensão portal Infecção por HIV Drogas e toxinas Agentes anorexígenos Hipertensão pulmonar persistente do recém – nascido Outros

Hipertensão Pulmonar Venosa

Doenças atriais ou ventriculares da câmara cardíaca esquerda Doenças valvulares da câmara cardíaca Esquerda Compressão extrínseca ou central Veias pulmonares Mediastinite fibrosante Adenopatia e/ou tumores Doença veno-oclusiva pulmonar Outros Exposição crônica a altas altitudes Doença pulmonar neonatal Displasia alvéolo-capilar Outros

Hipertensão Pulmonar resultante de doenças trombóticas e / ou embólicas crônicas

Obstrução tromboembólica de artérias pulmonares proximais Obstrução de artérias pulmonares distais Embolismo Pulmonar Trombose *in-situ*

Hipertensão Pulmonar resultante de desordens que afetam diretamente a vasculatura pulmonar Condições inflamatórias Sarcoidose Schistossomose Hemangiomatose capilar pulmonar

Outros

Hipertensão Pulmonar associada com desordens respiratórias e/ou hipoxemia

Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica Doença pulmonar intersticial Síndrome da apnéia do sono Hipoventilação alveolar http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html.

ANEXO II

CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DE PACIENTES COM HIPERTENSÃO PULMONAR

Classe I: Pacientes com hipertensão pulmonar mas sem limitações resultantes de atividade física. Atividade física usual não causa dispnéia ou fadiga, dor torácica ou síncope. Classe II: Pacientes com hipertensão pulmonar resultando em leve limitação da atividade física. Estes pacientes sentemse confortáveis ao repouso, mas atividade física usual causa dispnéia ou fadiga, dor torácica ou síncope. Classe III: Pacientes com hipertensão pulmonar resultando em marcada limitação da atividade física. Estes pacientes sentemse confortáveis ao repouso, mas atividade física menor que a usual causa dispnéia ou fadiga, dor torácica ou síncope. Classe IV: Pacientes com hipertensão pulmonar resultando em inabilidade para desenvolver qualquer atividade física sem sintomas. Estes pacientes manifestam sinais de insuficiência ventricular direita. Dispnéia e/ou fadiga podem estar presentes ao repouso, e desconforto é aumentado por qualquer atividade física.

44

*Modificado da classificação da New York Association para pacientes com doença cardíaca.

http://www.who.int/ncd/cvd/pph.html

ANEXO III

Pressão de vapor de água em diferentes temperaturas

Temp	P_{w}	Temp	P_{w}	Temp	P _w	Temp	P_{w}
0	4.6	10	9.2	20	17.5	30	31.
1	4.9	11	9.8	21	18.7	31	33.
2	5.3	12	10.5	22	19.8	33	35.
3	5.7	13	11.2	23	21.1	33	37.
4	6.1	14	12.0	24	22.4	34	39.
5	6.5	15	12.8	25	23.8	35	42.
6	7.0	16	13.6	26	25.2	36	44.
7	7.5	17	14.5	27	26.7	37	47.
8	8.0	18	15.5	28	28.3	38	49.
9	8.6	19	16.5	29	30.0	39	52.
10	9.2	20	17.5	30	31.8	40	53.

^a Dados do Handbook of Chemistry and Physics. ^b A pressão de vapor é dada por *torr* e a temperatura em °C. **Tabela I -** Valores de pressão sistólica máxima (PS max), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), e derivadas positiva e negativa da pressão / tempo do ventrículo direito em ratos dos grupos salina (n=10) e monocrotalina (n=10).

	Grupos			
Parâmetros	Salina	Monocrotalina		
PS max (mmHg)	26 ± 1	55 ± 3**		
PDI (mmHg)	$2,4\pm 0,2$	7,4 ± 1,3**		
PDF (mmHg)	$5 \pm 0,04$	$11,4 \pm 1,4^{**}$		
dP/dT (+) (mmHg/s)	569 ± 7	$1206 \pm 51**$		

$\frac{dP/dT()(mmHg/s)}{589 \pm 10} \qquad 1186 \pm 98^{**}$	

** p<0,01 indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

Tabela II - Valores de pressão sistólica máxima (PS max), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), e derivadas positiva e negativa da pressão / tempo do ventrículo esquerdo em ratos dos grupos salina e monocrotalina.

	Grupos			
Parâmetros	Salina	Monocrotalina		
PS (mmHg)	126 ± 1	124 ± 2		
PDI (mmHg)	$\textbf{-1,5} \pm \textbf{0,07}$	$-1,7\pm0,1$		
PDF (mmHg)	$9\pm0{,}2$	9 ± 0,2		
dP/dT (⁻) (mmHg/s)	2680 ± 32	$\textbf{2720} \pm \textbf{54}$		
dP/dT (⁺) (mmHg/s)	2756 ± 22	2805 ± 62		

Tabela III – Valores de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), platôs de bradicardia e taquicardia, amplitude, PA₅₀ e ganho médio, de ratos submetidos à avaliação do barorreflexo pela infusão contínua de fenilefrina e nitroprussiato de sódio dos grupos salina (n=8) e monocrotalina (n=8).

	Grupos				
Parâmetros	Salina	Monocrotalina			
PAM (mmHg)	112±3	107±6			
FC (bpm)	348±9	402±16*			
Platô de bradicardia (bpm)	250±12	276±16			
Platô de taquicardia (bpm)	454±17	466±17			
Amplitude (bpm)	204±7	189±17			
PA ₅₀ (mmHg)	117±3	116±5			
Ganho médio (bpm/mmHg)	-5,22±1	-2,67±0,2*			

PA₅₀, pressão arterial média no ponto médio da curva. *p<0,05 indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

 Tabela IV - Parâmetros morfométricos vasculares do grupo MCT comparado com o grupo salina.

	Grupos					
Parâmetros	Salina	МСТ				
Número de casos	4	6				
Número de vasos	20	55				
Espessura média da túnica média (µm)	9±3,2	12±7				
Raio médio (µm)	71±28	59,3±27,3				
Quociente espessura média/raio médio	0,138±0,063	0,212±0,097**				

**p<0,01 indica diferença estatisticamente significante em relação ao grupo salina.

<u>APÊNDICE I</u>

Salina	Peso inicial	Peso 1 ^ª sem	Peso 2ªsem	Peso 3ªsem
1	234	250	293	309
2	233	257	293	307
3	218	258	285	310
4	230	240	250	261
5	228	260	280	290
6	238	250	292	309
7	242	238	297	314
8	240	240	313	337
9	236	243	292	308
10	244	249	308	330
11	242	303	324	325
12	236	260	281	289
13	230	290	305	286
14	228	268	295	258
15	210	228	239	290
16	250	270	286	306
17	226	270	274	326
18	222	247	252	288
19	228	259	256	298
20	238	279	276	324
21	228	263	264	318
MÉDIA	232,43	258,19	283,57	303,95

Peso corporal inicial e final dos ratos do grupo Salina e MCT

|--|

Rato MCT	Peso inicial	Peso 1 ^a sem	Peso 2ªsem	Peso 3ªsem
1	224	235	258	283
2	220	242	251	315
3	221	236	242	294
4	213	239	255	300
5	212	228	236	293
6	212	229	252	253
7	222	267	271	270
8	238	283	298	314
9	222	267	287	292
10	226	256	256	269
11	216	275	283	280

EPM	2.69	3.37	4.00	4.13
MÉDIA	232,5	254,1	268,9	284,8
31	232	250	260	245
30	244	268	266	280
29	256	266	306	300
28	226	246	282	275
27	228	254	264	302
26	240	258	278	258
25	254	274	300	322
24	244	262	278	274
23	228	226	226	243
22	236	264	270	282
21	266	296	318	320
20	262	270	290	302
19	240	272	282	296
18	258	270	280	274
17	242	264	288	290
16	232	254	278	312
15	226	227	238	258
14	228	235	252	276
13	222	228	244	282
12	218	236	246	276

<u>APÊNDICE II</u>

Valores basais de PAM e FC de ratos dos grupos Salina e MCT

Ratos	FC Salina	FC MCT	PA Salina	PA MCT
1	395	400	120	120
2	300	350	120	83
3	350	350	120	115
4	395	365	110	120
5	330	300	110	132
6	350	445	100	105
7	340	420	100	100
8	352	450	107	85
9	350	330	100	123
10	320	310	100	113
11	388	350	104	110
12	370	332	116	106
13	362	387	118	115
14	319	420	111	123
15	358	300	117	93
16	427	405	120	82
17	319	440	111	117
18	300	390	119	80
19	423	380	115	110
20	395	390	118	125
21	350	310	100	100

APÊNDICE III

388,6333

9,44

Peso úmido e seco de VD e VE, com correção por peso corporal, dos ratos dos grupos Salina e MCT

Rato Salina	Peso úmido de VD	Peso úmido de VD corrigido	Peso Seco de VD	Peso seco de VD corrigido	Peso úmido de VE	Peso úmido de VE corrigido	Peso seco de VE	Peso seco de VE corrigido
1	0,129	0,507	0,031	0,118	0,458	1,8	0,106	0,413

26 27

29

31

Média

EPM

357,7278

4,95

109,6667

1,90

104,2667

2,69

EPM	0,01	0,02	0	0	0,03	0,03	0,01	0,03	
MÉDIA	0,13	0,5	0,033	0,12	0,49	1,86	0,12	0,41	
10	0,164	0,6	0,04	0,143	0,57	2,036	0,14	0,5	
9	0,129	0,507	0,031	0,118	0,458	1,803	0,106	0,413	
8	0,119	0,502	0,029	0,123	0,421	1,791	0,096	0,408	
7	0,091	0,384	0,022	0,093	0,442	1,861	0,102	0,43	
6	0,134	0,447	0,04	0,13	0,595	1,98	0,158	0,526	
5	0,181	0,603	0,043	0,14	0,519	1,73	0,122	0,41	
4	0,14	0,427	0,036	0,109	0,648	1,976	0,154	0,17	
3	0,119	0,502	0,029	0,123	0,421	1,791	0,096	0,408	
2	0,109	0,49	0,028	0,127	0,412	1,873	0,095	0,432	

Rato MCT	Peso úmido de VD	Peso úmido de VD corrigido	Peso Seco de VD	Peso seco de VD corrigido	Peso úmido de VE	Peso úmido de VE corrigido	Peso seco de VE	Peso seco de VE corrigido
1	0,3	1,02	0,064	0,217	0,62	2,1	0,135	0,457
2	0,424	1,54	0,094	0,342	0,457	1,66	0,101	0,37
3	0,323	1,2	0,062	0,23	0,568	2,104	0,125	0,463
4	0,46	1,7	0,091	0,34	0,502	1,86	0,103	0,38
5	0,424	1,894	0,11	0,049	0,441	1,967	0,116	0,518
6	0,31	1,2	0,117	0,45	0,453	1,74	0,076	0,29
7	0,292	0,973	0,088	0,292	0,422	1,41	0,138	0,46
8	0,37	1,275	0,077	0,265	0,6	2,07	0,138	0,475
9	0,26	0,9	0,04	0,138	0,49	1,69	0,11	0,379
10	0,21	0,8	0,05	0,178	0,55	1,964	0,13	0,464
MÉDIA	0,34	1,25	0,08	0,25	0,51	1,86	0,12	0,43
EPM	0.03	0.11	0.01	0.04	0.02	0.07	0.01	0.02

<u>APÊNDICE IV</u>

Peso úmido e seco de pulmão e fígado, com correção por peso corporal, dos ratos dos grupos salina e MCT

Rato salina	Pupul	Pupulcor	PsecPul	PsecPulcor	PuFig	Pufigcor	PsecFig	PsecFigcor
1	1,345	5,291	0,286	1,122				
2	1,168	5,310	0,262	1,190				
3	1,094	4,655	0,220	0,932				
4	2,094	6,384	0,435	1,326	14,378	43,830	6,190	18,872
5					11,483	38,277	4,822	16,070
6	1,768	5,890	0,463	1,540	13,452	44,840	4,710	15,700
7	1,102	4,650	0,231	0,975	14,800	49,300	6,186	20,620
8	1,094	4,655	0,220	0,932	13,550	15,630	5,784	18,220
9	1,345	5,291	0,286	1,122	14,214	52,640	5,554	19,500
10	1,160	5,536	0,300	1,071	11,600	41,428	4,280	15,280
MÉDIA	1,35	5,30	0,30	1,1	13,4	40,8	5,4	17,8
EPM	0,12	0,20	0,03	0,07	0,50	4,57	0,29	0,79

Rato MCT	Pupul	Pupulcor	PsecPul	PsecPulcor	PuFig	Pufigcor	PsecFig	PsecFigcor
1					11,600	41,428	4,280	15,280
2					14,000	47,460	6,985	23,678
3	2,250	7,63	0,507	1,719	12,615	45,870	5,316	19,330
4	2,750	10,0	0,437	1,589	13,496	49,985	5,573	20,640
5	2,777	10,3	0,574	2,126	14,214	52,640	5,554	20,570
6	1,930	6,430	0,447	1,490	12,300	41,000	6,148	20,494
7	2,420	8,345	0,591	2,038	13,200	45,520	6,461	22,280
8	1,690	5,827	0,480	1,655	10,070	33,566	3,370	11,230
9	1,800	6,430	0,420	1,500	10,500	37,500	4,320	15,430
MÉDIA	2,23	7,8	0,49	1,73	12,4	43,9	5,3	18,8
EPM	0,17	0,67	0,03	0,10	0,49	2,02	0,39	1,33

<u>APÊNDICE V</u>

60

Gasometria dos ratos dos grupos Salina e MCT

61

Grupo Salina

Rato					
Salina	рΗ	pCO ₂	pO ₂	HCO ₃ ⁻	SatO ₂
1	7,519	34,3	90,5	27,7	97,5
2	7,489	33,3	103,9	25,1	98,2
3	7,551	23,0	81,3	20,2	97,1
4	7,505	31,5	93,2	24,7	97,7
5	7,469	27,1	113,3	19,4	98,5
6	7,497	31,8	83,9	24,4	96,9
7	7,450	35,6	101,6	24,4	97,9
8	7,481	33,3	92,6	24,5	97,5
9	7,502	25,8	107,2	20,0	98,4
10	7,501	30,0	96,8	23,2	97,9
MÉDIA	7,496	30,6	96,4	23,4	97,8
EPM	0,01	1,29	3,21	0,84	0,17

Rato MCT	рН	pCO ₂	pO₂	HCO ₃ ⁻	SatO ₂
1	7,512	31,7	89,8	25,2	97,5
2	7,481	33,3	92,6	24,5	97,5
3	7,393	31,5	71,4	18,8	94,1
4	7,484	36,2	86,4	26,9	97,0
5	7,478	33,0	91,2	24,1	97,4
6	7,414	35,2	85,2	22,1	96,4
7	7,484	33,1	77,9	24,6	96,1
8	7,459	34,2	77,4	23,9	95,8
MÉDIA	7,463	33,5	83,9	23,7	96,4
EPM	0,01	0,57	2,69	0.85	0.41

<u>APÊNDICE VI</u>

Alterações da PAM e FC promovidas pela ativação do Reflexo de Bezold-Jarisch nas doses de 1,5, 3, 6, 12 e 24 µg/kg em ratos dos grupos

Salina e MCT

Grupo Salina

Rato #	PAM basal	1,5	3	6	12	24 µg/kg
1	115	-31	-54	-55	-75	-77
2	118	-26	-69	-76	-103	-99

62

EPM	2,61	7,87	8,41	3,88	8,49	9,10
MÉDIA	113	-42	-65	-71	-77	-81
9	106	-11	-38	-83	-26	-26
8	100	-40	-24	-83	-49	-49
7	106	-33	-87	-72	-72	-76
6	118	-68	-67	-51	-88	-97
5	118	-25	-68	-77	-103	-98
4	114	-67	-110	-67	-94	-94
3	125	-80	-70	-79	-81	-110

Rato #	FC basal	1,5	3	6	12	24 µg/kg
1	411	-182	-226	-238	-248	-213
2	362	-160	-240	-267	-280	-333
3	380	-285	-300	-305	-300	-314
4	368	-279	-283	-292	-290	-305
5	371	-156	-242	-270	-275	-325
6	344	-243	-207	-235	-263	-294
7	368	-63	-202	-258	-268	-280
8	352	-184	-224	-139	-239	-260
9	313	-82	-157	-200	-168	-191
MÉDIA	363	-181	-231	-244	-259	-279
EPM	8,89	26,10	14,26	16,87	13,04	16,51

			FBG-I	МСТ			
Rato #	GRUPO	PAM basal	1,5	3	6	12	24µg/kg
1	MCT	121	-25	-63	-75	-92	-89
2	MCT	128	-61	-58	-91	-73	-59
3	MCT	125	-39	-43	-51	-50	-53
4	MCT	117	-50	-38	-36	-44	-50
5	MCT	129	-74	-51	-73	-70	-75
6	MCT	100	-82	-79	-64	-80	-89
7	MCT	103	-38	-79	-62	-74	-65
8	MCT	81	-25	-10	-33	-24	-43
9	MCT	98	-47	-62	-60	-59	-61
	MÉDIA	111	-49	-54	-60	-63	-65
	EPM	5,53	6,70	7,22	6,19	6,94	5,47

Rato #	GRUPO	FC basal	1,5	3	6	12	24µg/kg
1	MCT	423	-220	-371	-209	-371	-383
2	MCT	324	-216	-238	-247	-257	-276

Grupo Monocrotalina
3 MCT 394 -243 -192 -261 -238 -247 MCT 4 433 -259 -265 -372 -329 -390 5 MCT 426 -190 -196 -207 -192 -246 6 MCT 368 -223 -224 -286 -321 -256 7 MCT 410 -227 -345 -329 -334 -360 MCT -283 8 422 -210 -220 -245 -267 9 MCT 406 -247 -283 -332 -330 -332 MÉDIA -269 401 -226 -263 -289 -315 EPM 11,63 6,99 20,70 19,99 18,84 18,46

<u>APÊNDICE VII</u>

Alterações da PAM e FC promovidas pela ativação do Quimiorreflexo nas doses de 10, 20, 40 e 80 µg/0,05 ml (IV) em ratos dos grupos Salina e

KCN - Grupo Salina										
Rato #	GRUPO	PA basal	10	20	40	80 µg/kg				
1	CONT	104	7	18	23	35				
2	CONT	116	3	37	30	39				
3	CONT	118	0	63	65	68				
4	CONT	111	10	60	69	61				
5	CONT	117	0	61	60	81				
7	CONT	120	24	44	46	46				
8	CONT	111	10	60	65	64				
9	CONT	119	0	29	37	40				
10	CONT	115	0	42	51	48				
	MÉDIA	114	6	46	49	53				
	EPM	1,69	2,66	5,37	5,56	5,21				

Rato #	GRUPO	FC basal	10	20	40	80 µg/kg
1	CONT	388	-22	-275	-283	-285
2	CONT	370	-5	-213	-255	-250
3	CONT	362	0	-279	-246	-372
4	CONT	319	-30	-175	-234	-302
5	CONT	358	0	-221	-238	-240

<u>MCT</u>

66

7	CONT	427	-24	-266	-270	-305
8	CONT	319	-15	-169	-242	-248
9	CONT	300	0	-105	-161	-180
10	CONT	423	0	-247	-234	-303
	MÉDIA	363	-11	-217	-240	-276
	EPM	15,02	4,06	19,42	11,38	18,07

KCN-MCT									
Rato #	GRUPO	PA basal	10	20	40	80 µg/kg			
1	MCT	123	4,0	25,0	33,0	34,0			
2	MCT	113	5,0	36,0	39,0	43,0			
3	MCT	110	3,0	29,0	34,0	30,0			
4	MCT	106	2,3	24,2	25,7	32,0			
5	MCT	115	3,0	30,0	33,0	35,0			
6	MCT	123	0,0	26,0	34,0	42,0			
7	MCT	93	0,0	34,0	35,0	28,0			
8	MCT	82	6,2	42,0	25,0	19,0			
	MÉDIA	108	2,9	31,0	32,3	33			

EPM 5,06 0,78 2,18 1,67 2,73						
	EPM	5,06	0,78	2,18	1,67	2,73

Rato #	GRUPO	FC basal	10	20	40	80 µg/kg
1	MCT	328	-8,0	-10,0	-17,0	-23,0
2	MCT	307	-6,0	-48,0	-109,0	-151,0
3	MCT	350	-3,0	-30,0	-80,0	-100,0
4	MCT	332	0,0	0,0	-52,0	-56,0
5	MCT	387	-4,0	-47,0	-85,0	-105,0
6	MCT	420	0,0	-0,3	-47,0	-51,0
7	MCT	298	0,0	-23,0	-83,0	-103,0
8	MCT	405	-6,0	-82,0	-180,3	-220,0
	MÉDIA	353	-3,4	-30,0	-81,6	-101,1
	EPM	16,13	1,12	9,95	17,30	22,08

<u>APÊNDICE VIII</u>

Alterações da FC promovidas após bloqueio autonômico com atenolol e metil-atropina na dose de 2 mg/kg/ ml (IV) em ratos dos grupos Salina e

MCT

Rato #	GRUPO	FC basal	atenolol	atropina	Δ atenolol	Δ atropina
1	salina	375	349	405	-26	56
2	salina	356	325	390	-31	65
3	salina	357	325	401	-32	76
4	salina	375	359	395	-16	36
5	salina	386	351	374	-35	23
6	salina	388	358	430	-30	72
7	salina	369	321	377	-48	56
8	salina	347	321	376	-26	55
	MÉDIA	369	339	393	-30,5	55
	EPM	5,21	6,04	6,67	3,22	6,29

Rato #	GRUPO	FC basal	atenolol	atropina	∆ atenolol	∆ atropina
1	MCT	379	283	297	-96	14
2	MCT	472	394	400	-78	6
3	MCT	428	364	377	-64	13
4	MCT	404	351	365	-53	14
5	MCT	360	345	366	-15	21
6	MCT	482	428	434	-54	6
	MÉDIA	421	361	373	-60	12
	EPM	20.12	20.02	18.58	11.17	2.32

<u>APÊNDICE IX</u>

Estimativa de parâmetros quantimétricos vasculares de arteríolas pulmonares de ratos dos grupos Salina e MCT

RATO	GRUPO	FOTO	VASO	R	ТМ	TM/R
R01	МСТ	19	19-1	50,63	10,31	0,2036
R01	МСТ	20	20-1	79,11	32,48	0,4106
R01	МСТ	21	21-A	107,59	26,35	0,2449
R01	МСТ	21	21-B	41,14	10,79	0,2623
R01	МСТ	22	22-1	39,87	12,94	0,3246
R01	МСТ	23	23-A	20,25	5,81	0,2869
R01	МСТ	23	23-B	41,77	11,35	0,2717
R01	МСТ	24	24-A/42-B	65,19	8,96	0,1374
R01	МСТ	24	24-B/42-A	126,58	22,47	0,1775
R01	МСТ	25	25-A/43-A	104,74	31,72	0,3028
R01	МСТ	25	25-B/43-B	28,75	6,99	0,2431
R01	МСТ	26	26/44/69	68,99	11,57	0,1677
R01	МСТ	27	27/45/70	41,77	8,27	0,1980
R01	МСТ	41	41-A	18,35	5,25	0,2861
R01	МСТ	41	41-B	36,07	11,68	0,3238
R01	МСТ	47	47/71	24,68	8,47	0,3432
R02	МСТ	13	13-1	38,61	10,09	0,2613
R02	МСТ	14	14-1	65,19	6,95	0,1066
R02	МСТ	15	15-1	54,43	4,95	0,0909
R02	МСТ	16	16-1	44,94	8,00	0,1780
R02	МСТ	17	17-1	70,88	17,10	0,2413
R02	МСТ	18	18-1	62,66	7,55	0,1205
R03	МСТ	10	10-1	30,38	7,53	0,2479
R03	МСТ	11	11-1	29,11	8,77	0,3013
R03	МСТ	12	12-1	75,31	9,34	0,1240
R03	МСТ	03	03-1	44,94	6,60	0,1469
R03	МСТ	04	04-1	38,61	5,62	0,1456

ANEXOS

R03	МСТ	05	05-1	36,07	5,66	0,1569
R03	МСТ	06	06-1	34,81	7,32	0,2103
R03	МСТ	07	07-1	112,02	29,71	0,2652
R03	МСТ	08	08-1	99,36	14,68	0,1477
R03	МСТ	09	09-1	43,04	6,36	0,1478
R04	МСТ	01	01-1	84,17	23,02	0,2735
R04	МСТ	02	02-1	50,63	11,70	0,2311
R04	МСТ	48	48-1	56,96	11,51	0,2021
R04	МСТ	49	49-A	62,66	7,90	0,1261
R04	МСТ	49	49-B	34,18	8,88	0,2598
R04	МСТ	50	50-1	58,23	11,83	0,2032
R04	МСТ	51	51-1	94,93	13,26	0,1397
R04	МСТ	52	52-1	37,97	8,94	0,2354
R05	МСТ	53	53-1	59,49	9,70	0,1631
R05	МСТ	54	54-1	86,71	12,01	0,1385
R05	МСТ	55	55-1	32,91	13,30	0,4041
R05	МСТ	56	56-1	55,06	7,69	0,1397
R05	МСТ	57	57-1	77,21	17,51	0,2268
R05	МСТ	58	58-1	98,10	31,12	0,3172
R05	МСТ	59	59-1	53,16	8,72	0,1640
R05	МСТ	60	60-1	53,80	8,04	0,1494
R05	МСТ	61	61-1	72,15	12,78	0,1771
R06	МСТ	62	62-1	94,93	17,91	0,1887
R06	МСТ	63	63-1	17,09	10,87	0,6360
R06	МСТ	64	64-1	63,92	8,95	0,1400
R06	МСТ	65	65-1	126,58	5,40	0,0427
R06	МСТ	66	66-1	50,63	7,01	0,1385
R06	МСТ	67	67-1	62,66	8,76	0,1398

ANEXOS

R07	SALINA	35	35-1	60,12	14,53	0,2417
R07	SALINA	36	36-1	75,95	9,41	0,1239
R07	SALINA	37	37-1	120,25	9,69	0,0806
R07	SALINA	38	38-1	46,20	5,74	0,1242
R07	SALINA	68	68-1	120,25	12,21	0,1015
R08	SALINA	30	30-1	71,52	9,32	0,1303
R08	SALINA	31	31-1	67,09	6,11	0,0911
R08	SALINA	32	32-1	48,10	14,97	0,3112
R08	SALINA	33	33-1	62,02	9,19	0,1482
R08	SALINA	34	34-1	69,32	7,98	0,1151
R09	SALINA	28	28-1	131,64	12,85	0,0976
R09	SALINA	29	29-1	84,81	12,12	0,1429
R09	SALINA	39	39-1	70,25	5,85	0,0833
R09	SALINA	40	40-1	76,58	8,05	0,1051
R10	SALINA	72	72-1	41,77	8,75	0,2095
R10	SALINA	73	73-1	67,72	7,04	0,1040
R10	SALINA	74	74-1	48,73	4,56	0,0936
R10	SALINA	75	75-1	16,46	3,98	0,2418
R10	SALINA	76	76-1	51,26	5,44	0,1061
R10	SALINA	77	77-1	91.77	10.23	0.1115

<u>APÊNDICE X</u>

Estimativa de parâmetros quantimétricos vasculares de arteríolas pulmonares de ratos dos grupos Salina e MCT

	RAIO		T	Μ	TM/R		
	SALINA	МСТ	SALINA	МСТ	SALINA	МСТ	
MÉDIA:	71,09	59,27	8,90	11,97	0,1382	0,2166	
s:	28,37	27,30	3,21	7,03	0,0629	0,0971	
p25:	50,63	38,61	6,05	7,62	0,1006	0,1462	
p50:	68,52	54,43	8,97	9,34	0,1133	0,2021	
p75:	78,64	73,73	10,70	12,86	0,1442	0,2637	

R = Raio TM = Túnica média TM / R = Relação túnica média / raio ANEXOS