

**Avaliação Cardiovascular e Respiratória de Ratas
Ooforectomizadas Submetidas a Hipertensão Arterial
Pulmonar Induzida pela Monocrotalina**

Pablo Lúcio Gava

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Vitória, Dezembro de 2010

Avaliação Cardiovascular e Respiratória de Ratas Ooforectomizadas Submetidas a Hipertensão Arterial Pulmonar Induzida pela Monocrotalina

Pablo Lúcio Gava

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em/...../....., por:

Prof. Dra. Margareth Ribeiro Moysés – Orientadora, UFES

Prof. Dr. Hélder Mauad – Co-Orientador, UFES

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira – Banca Examinadora, UFES

Prof. Dr. José Guilherme Pires – Banca Examinadora, UFES

Coordenador do PPGCF: _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, Dezembro de 2010

Gava, Pablo Lúcio, 1979

Avaliação Cardiovascular e Respiratória de Ratas Ooforectomizadas Submetidas a Hipertensão Arterial Pulmonar Induzida pela Monocrotalina. [Vitória] 2010

xviii, 160 p. 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2010)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

A meus pais.

***“Somos todos muito ignorantes,
mas nem todos ignoramos
as mesmas coisas.”***

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iix
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIACOES.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	31
MATERIAL E MÉTODOS DOS PROTOCOLOS REALIZADOS.....	33
1.0 – Local.....	34
2.0 – Animais experimentais.....	34
3.0 – Tratamento dos animais para indução da Hipertensão Pulmonar....	34
4.0 – Castração dos animais (Ooforectomia).....	35
5.0 – Registro pletismogrfico de corpo inteiro.....	35
5.1 – Cálculo dos parâmetros ventilatórios.....	37
5.2 – Fator de correção.....	39
5.3 - Outras variáveis ventilatórias calculadas.....	39
6.0 – Cateterização artéria e veia femoral.....	40
7.0 – Registro direto da pressão arterial e da frequência cardica.....	40
8.0 – Avaliação dos componentes autonômicos.....	41
9.0 – Avaliação das pressões ventriculares.....	41
10.0 – Avaliação dos reflexos cardiovasculares.....	42
10.1 – Avaliação do Barorreflexo.....	42

10.2 – Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch.....	45
11.0 – Avaliação gasométrica.....	45
12.0 – Determinação dos pesos seco e úmido dos ventrículos.....	45
12.1– Histologia Pulmonar.....	46
13.0 – Análise Morfológica.....	46
14.0 – Análise estatística.....	47
15.0 – Drogas e substâncias utilizadas.....	48
RESULTADOS.....	49
1.0 – Peso corporal.....	50
2.0 – Peso do útero.....	52
3.0 – Pressões ventriculares.....	53
3.1 – Pressão sistólica máxima do ventrículo direito.....	53
3.2 – Pressão diastólica do ventrículo direito.....	54
3.3 – Pressão sistólica máxima do ventrículo esquerdo.....	56
3.4 – Pressão diastólica do ventrículo esquerdo.....	57
4.0 – Peso úmido e seco de coração.....	59
5.0 – Valores basais de PAM e FC.....	64
6.0 – Avaliação autonômica.....	67
7.0 – Registros ventilatórios.....	69
8.0 – Gasometria.....	71
9.0 – Avaliação dos reflexos cardiovasculares.....	74
9.1 - Avaliação do Barorreflexo.....	74
9.2- Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch.....	80
10.0 – Avaliação histológica.....	82
DISCUSSÃO.....	88

1.0 – Avaliação do peso corporal e eficácia da ooforectomia.....	89
2.0 – Índice Pulmonar e avaliação histológica.....	92
3.0 – Avaliação respiratória e gasométrica.....	93
4.0 – Avaliação autonômica.....	98
5.0 – Alterações hemodinâmicas da HAP e ooforectomia.....	104
6.0 – Avaliação barorreflexa em ratas submetidas à HAP e ooforectomia.....	111
7.0 – Avaliação do reflexo Bezold-Jarisch (RBJ) em ratas submetidas à HAP e ooforectomia.....	114
CONCLUSÃO.....	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
APÊNDICES.....	153
ANEXOS.....	156

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores da pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), $dP/dT(+)$ e $AP/dT(-)$ do VD dos animais dos grupos CON, MCT, OVX e OVX+MCT.

Tabela 2 – Tabela II - Valores da pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), $dP/dT(+)$ e $dP/dT(-)$ do VE dos animais dos grupos CON, MCT, OVX e OVX+MCT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Câmara pletismográfica.

Figura 2 – Modelo da curva sigmoidal barorreflexa.

Figura 3 – Variação de peso corporal dos animais ao início, na 1^a, 2^a, 3^a e na 4^a semana após injeção de monocrotalina.

Figura 4 – Valores dos pesos do útero (corrigido pelo corporal).

Figura 5 – Valores de pressão sistólica máxima do ventrículo direito.

Figura 6 – Valores de pressão sistólica máxima do ventrículo esquerdo.

Figura 7 – Valores de peso úmido (A) e seco (B) do ventrículo direito (corrigido por peso corporal).

Figura 8 – Valores de peso úmido (A) e seco (B) do ventrículo esquerdo (corrigido por peso corporal).

Figura 9 – Índice Pulmonar (VD/VE + septo g/100g).

Figura 10 – Valores basais de PAM (A) e FC média (B).

Figura 11 – Alterações de FC após bloqueio com atenolol e metil-atropina.

Figura 12 – Valores de volume corrente (V_C) (A), frequência respiratória (FR) (B) e ventilação (V_{min}) (C).

Figura 13 – Valores gasométricos da parcial de O_2 no sangue arterial (PaO_2) (A) e da porcentagem de saturação de hemoglobina (SatHb) (B).

Figura 14 – Valores gasométricos do potencial hidrogeniônico (pH) (A), pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial ($PaCO_2$) (B) e do bicarbonato (HCO_3^-) (C).

Figura 15 – Barocurvas sigmoidais (A) e a primeira derivada logística sigmoidal (ganho máximo) (B).

Figura 16 – Respostas pressoras induzidas pela Fenilefrina (A) e bradicardias reflexas (B).

Figura 17 – Respostas depressoras induzidas pelo Nitroprussiato de Sódio (A) e taquicardias reflexas (B)

Figura 18 – Reflexo Bezold-Jarisch – variação de FC (ΔFC) (A) e variação de PAM (ΔPAM) (B) à estimulação de FBG nas doses 1,5; 3; 6; 12 2 24 $\mu g/Kg$.

Figura 19 – Fotomicrografia em menor e maior aumento do parênquima pulmonar dos grupos CON (A e B), OVX (C e D), MCT (E e F) e OVX+MCT (G e H) destacando a hipertrofia da camada média de um ramo da artéria pulmonar dos grupos MCTs.

Figura 20 – Espessura da parede vascular (A), relação diâmetro interno/diâmetro externo vascular (B) e relação espessura da parede/diâmetro interno.

Figura 21 – Fotomicrografia em menor e maior aumento do parênquima pulmonar dos grupos CON (A e B), OVX (C e D), MCT (E e F) e OVX+MCT (G e H) destacando a neomuscularização dos vasos arteriais.

Figura 22 – Número de vasos por mm^2 dos lobos pulmonares.

LISTA DE ABREVIÇÕES

Δ FC – Variação da frequência cardíaca

Δ PAM – Variação da pressão arterial média

5-HT - 5-hidroxitriptamina

BMPR2 – receptor de proteína morfogenética óssea tipo II

bpm – Batimentos por minuto

cpm – Ciclos por minuto

ET-1 – Endotelina 1

FBG – Fenilbiguanida

FC – Frequência cardíaca

FR – Frequência respiratória

HCO_3^- – Íon Bicarbonato

HAP – Hipertensão Arterial Pulmonar

HE – hematoxilina/eosina

HP – Hipertensão pulmonar

HPP – Hipertensão arterial pulmonar primária

KCN – Cianeto de potássio

MCT – Monocrotalina

mmHg – Milímetros de mercúrio

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PA – Pressão arterial

PaCO₂ – Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial

PDI – Pressão diastólica inicial

PDF – Pressão diastólica final

PGI₂ – Prostaciclina

pH – Potencial hidrogeniônico

PSmax – Pressão sistólica máxima

RVAP – Resistência vascular arterial pulmonar

RBJ – Reflexo Bezold-Jarisch

Sat Hb – Saturação de hemoglobina

SNA - Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

V_A – Ventilação alveolar

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

V_C – Volume-corrente

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

V_{min} – Volume-minuto

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida pela monocrotalina (MCT) constitui um quadro fisiopatológico que envolve várias alterações cardiovasculares, respiratórias e autonômicas. Estudos em modelos experimentais sugerem que os hormônios sexuais femininos apresentam um efeito protetor no desenvolvimento da HAP. Entretanto, os efeitos da deficiência destes hormônios sobre a HAP permanecem por serem melhor caracterizados. Os objetivos deste estudo foram avaliar as alterações hemodinâmicas, morfológicas, autonômicas, cardiovasculares reflexas, respiratórias e gasométricas decorrentes da HAP, em fêmeas ooforectomizadas (OVX) e cirurgia fictícia (SHAM). Para tanto, foram utilizadas ratas Wistar (200-220 g), divididas em 4 grupos: CON, MCT, OVX e OVX+MCT. As ratas foram submetidas a ooforectomia ou SHAM e após 10 dias receberam uma injeção subcutânea única de MCT (60 mg/Kg) ou o mesmo volume de salina (~0,8 mL). Após 4 semanas foram realizados os registros cardiovasculares, respiratórios, gasométricos e histologia pulmonar. Os resultados mostraram um significativo aumento do peso seco e úmido do ventrículo direito (VD), bem como do Índice Pulmonar nos grupos tratados com MCT quando comparado aos seus respectivos grupos controles. Foi observado também que os grupos MCTs apresentaram valores significativamente elevados de pressão sistólica máxima (PSmax) do VD em relação ao seu respectivos grupo controle. Além disso, também observamos que o grupo OVX apresentou a PSmax do VD elevada quando comparado ao grupo CON. As análises morfológicas revelaram um acentuado espessamento da camada média dos ramos distais da artéria pulmonar nos grupos MCTs. Em relação a avaliação autonômica, observamos um aumento significativo do componente simpático, bem como uma atenuação do componente parassimpático nos grupos MCT, OVX e OVX+MCT. Quanto aos parâmetros respiratórios, observamos um aumento da ventilação alveolar (V_A) no grupo MCT, enquanto que o grupo OVX+MCT apresentou uma redução deste parâmetro. A avaliação gasométrica mostrou que os grupos MCTs apresentam uma diminuição da pressão parcial de O_2 (PaO_2) e redução da porcentagem de saturação da hemoglobina

(%Sat Hb) quando comparado a seus respectivos grupos controles, porém, o grupo OVX+MCT apresentou uma redução da %Sat Hb quando comparado ao MCT. Em relação aos reflexos cardiovasculares, observamos uma atenuação do ganho barorreflexo nos grupos MCTs e também uma maior redução no grupo OVX+MCT comparado ao MCT. Na avaliação do Reflexo Bezol-Jarisch (RBJ) observamos uma atenuação da resposta hipotensora nos grupos MCTs, porém, somente o grupo OVX+MCT apresentou uma atenuação da resposta bradicárdica. Estes resultados sugerem que a MCT promove importantes alterações cardiovasculares, autonômicas, morfológicas, respiratórias, gasométricas, as quais são agravadas pela ooforectomia, sugerindo que os hormônios sexuais femininos possuem uma importante função protetora neste modelo de HAP.

Palavras chave: ooforectomia; hipertensão arterial pulmonar; monocrotalina; reflexos cardiovasculares.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) induced by monocrotaline (MCT) constitutes the pathophysiological conditions that involve several cardiovascular, respiratory and autonomic changes. Previous experimental model studies suggest that female sex hormones provide protective effects in the development of PAH. However, effects arising from the deficiency of these hormones on the PAH remain to be elucidated. The aims of the present study were to evaluate the possible hemodynamic, morphological, respiratory and gasometrical changes arising from PAH in female rats submitted to oophorectomy and sham-operated. Wistar female rats were used (200-220 g) and divided into 4 groups: control (CON), MCT, OVX and OVX+MCT. Rats were submitted to OVX or SHAM, and 10 days later, received a single injection of MCT (60 mg/kg, SC), or the same volume of saline (~0.8 mL). After 4 weeks, recordings of cardiovascular, respiratory, gasometric were made and pulmonary histology. The results showed a significant increase of the dry and wet weight of the right ventricle, as well as pulmonary index in MCT groups, compared to respective control groups. We also observed that MCT groups showed values significantly higher of the peak systolic pressure (PS_{max}) of VD in relation to the respective control group. These findings were also observed in relation to the OVX group and the respective control group. The morphological analysis showed a marked thickening of the media layer of the distal branches of the pulmonary artery in the MTC groups. In relation to autonomic evaluation, we observed a significant increase of a sympathetic component, as well as an attenuation of the parasympathetic component in the MCT, OVX and OVX+MCT groups. For the respiratory parameters, we observed an increase of the alveolar ventilation in the MCT group, while OVX+MCT group showed an attenuation of this parameter. Gasometric evaluation showed that MCT groups present a reduction in the partial pressure of O₂ (PaO₂) and reduction of the percentage of the hemoglobin saturation (% Sat Hb) when compared to respective control groups, but OVX+MCT group showed an attenuation of the %Sat Hb when compared to MCT. In relation to cardiovascular reflexes, we observed an attenuation of the baroreflex

gain in the MCT groups and also a higher reduction in the OVX+MCT group compared to MCT. In the Bezold-Jarisch reflex evaluation, we observed an attenuation of the hypotensive responses in the MCT groups, but only in OVX+MCT group was an attenuation of the bradycardic responses observed. These data suggest that MCT produces important cardiovascular, autonomic, morphological, respiratory and gasometric changes, which are worsened by oophorectomy. Therefore, these results indicate that female sex hormones play an important protective function in this model of PAH.

Keywords: oophorectomy, pulmonary arterial hypertension, monocrotaline, cardiovascular reflexes.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é definida como uma elevação da pressão arterial pulmonar acima de 25 mmHg no repouso e acima 30 mmHg no exercício, com uma pressão de cunha capilar pulmonar média menor que 15 mmHg (Farber e Loscalzo, 2004). A combinação de três fatores é responsável pelo aumento da resistência vascular pulmonar em pacientes com HAP: vasoconstrição, remodelamento da parede vascular e trombose *in situ* (Rubin, 1997). Uma característica precoce da doença é a disfunção endotelial da artéria pulmonar, que está associada a uma vasoconstrição ocasionada por um desequilíbrio entre os fatores de relaxamento e de contração derivados do endotélio (Archer e Michelakis, 2009), que evolui para um remodelamento vascular, caracterizado por lesões plexiformes, hipertrofia da camada média, fibrose laminar concêntrica da íntima, degeneração fibrinóide e lesões trombóticas (Runo e Loyd, 2003). Estas alterações promovem um aumento da pós-carga do ventrículo direito (VD) (Michelakis et al., 2008) que evolui para hipertrofia direita, diminuição do débito cardíaco e falência ventricular direita (Kawut et al., 2009). Apesar do estímulo inicial ou lesão que desencadeia a doença ser desconhecido, este pode estar relacionado com anormalidades genéticas, como mutação de receptores de proteínas morfogenéticas ósseas tipo II (BMP2), ou fatores ambientais como drogas, vírus ou toxinas, por exemplo (Michelakis et al., 2008).

A hipertensão pulmonar (HP) inicialmente era classificada como primária ou secundária, desde a primeira conferência internacional sobre Hipertensão Arterial Pulmonar Primária (HAPP) realizada em 1973 e organizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Entretanto, pelo fato de existirem características histopatológicas, assim como respostas ao tratamento semelhantes entre as duas classificações, a OMS, através do 2º Simpósio Mundial de HP realizado na cidade de Evian, França, em 1998, classificou a HP em 5 grupos principais baseados em critérios fisiopatológicos da doença (Runo e Loyd, 2003). Porém esta classificação foi reformulada em 2003 no 3º Simpósio Mundial, realizado

em Veneza, na Itália (McLaughlin e McGoon, 2006) e atualizada em 2008 no quarto 4^o Simpósio Mundial sobre a doença, realizado em Dana Point, nos EUA (Simmonneau et al., 2009) (vide anexo 1), a saber: 1- HAP, 2- HP devido a doença do coração esquerdo, 3- HP devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia, 4- HP tromboembólica crônica e 5- HP com mecanismos multifatoriais desconhecidos. Segundo esta classificação, fica estabelecido que a HAP é uma das formas pela qual a HP se apresenta. Além das diferenças etiológicas, também foram classificadas as características histológicas das diferentes lesões vasculares de cada grupo (vide anexo 2) (Stenmark et al., 2009). Existe ainda uma classificação funcional que está associada aos sintomas da HAP (vide anexo 3) (Humbert et al., 2004).

A HAP é uma doença que possui um prognóstico ruim, sua taxa de mortalidade varia entre 20 a 40% após três anos do diagnóstico da doença quando não tratada (Sitbon et al., 2002). De acordo com um estudo sobre a prevalência desta doença, realizado pelo Centro de Controle de Doenças dos EUA, a HP foi diagnosticada em 260 mil pacientes em 2002 (Hyduk et al., 2005). Estima-se que a prevalência da HAP seja 1 a 2 casos por 1 milhão de pessoas na população geral (Gaine e Rubin, 1998). Apesar das doenças cardiovasculares (de um modo geral) acometerem menos mulheres pré-menopausais quando comparado aos homens da mesma idade (Rossouw, 2002; Stork et al., 2004; Meendering et al., 2008), a prevalência da HAP é duas vezes maior em pacientes do sexo feminino (Loyd et al., 1995; De Marco, 2006) e pode estar presente em qualquer idade. Entretanto é mais comum na terceira década de vida da mulher e na quarta década no homem, com uma média de idade de diagnóstico da doença de 36 anos (Rich et al., 1987). Vários fatores de risco predis põem ao desenvolvimento de HAP (vide anexo 4). Apesar da relação dos hormônios sexuais femininos, tal como o estrogênio, com a HAP ter sido postulada devido a sua maior prevalência no sexo feminino, nenhum estudo epidemiológico demonstrou alguma correlação com o uso de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal (Abenham et al., 1996).

Estudos epidemiológicos mostraram que uma quantidade maior de homens, com idade inferior a 45 anos, morrem por ano devido as doenças cardiovasculares quando comparado as mulheres da mesma idade (Albert et al., 1996; Thom e Epstein, 1994). Entretanto, esses dados se reverterem quando se compara com mulheres na menopausa por volta dos 50 anos de idade, onde mais mulheres morrem devido a doenças cardiovasculares (Sourander et al., 1998). O mecanismo pelo qual o estrogênio protege o sistema cardiovascular ainda não está completamente elucidado, mas acredita-se que um dos fatores esteja relacionado com a modulação autonômica (Rui et al., 1998; Saleh et al., 2000).

Em relação ao estrogênio, vários estudos demonstraram que este hormônio exerce efeito benéfico na vasculatura pulmonar (Sakao et al., 2010). As ações do estrogênio podem ocorrer de duas formas: genômica, através de fatores de transcrição que alteram a expressão gênica (Webb et al., 1995; Petterson et al., 1997; Ray et al., 1997; Schlegel et al., 1999), e não-genômica, através da modulação de vias intracelulares, as quais provocam alterações agudas e de curta duração (Watters et al., 1997; Nadal et al., 1998; Kim et al., 1999; Watson et al., 1999). A modulação destes dois mecanismos é feita através de dois tipos de receptores de estrogênio (RE), o receptor do tipo α (RE- α) e o receptor do tipo β (RE- β) (Walter et al., 1985; Evans et al., 1988; Brown et al., 1994; Kniper et al., 1996; Shibata et al., 1997) e, no caso do receptor não-genômico, também existe um receptor acoplado a proteína G da membrana celular (Meldrum et al., 2007). Estes receptores de estrogênio estão localizados em vários tecidos, tais como os vasos sanguíneos, o sistema nervoso central (SNC), as mamas, o útero, o tecido adiposo, o fígado, o trato gastrointestinal, a pele e outros (Calle et al., 1995; Paganini-Hill et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Nos vasos sanguíneos, eles se localizam no endotélio e no músculo liso vascular (Mendelsohn et al., 1994; Farhat et al., 1996). Nas células endoteliais, inclusive as do leito vascular pulmonar (Sylvester et al. 1985; Gordon et al., 1986; Kauser e Rubanyi, 1997; Gonzales e Kanagy, 1999; Gonzales et al. 2001), o estrogênio promove aumento da

produção e liberação de óxido nítrico (ON) (Lantin-Hermoso et al., 1997; Caulin-Glaser et al., 1997), reduz a expressão de endotelina 1 (ET-1) (Earley e Resta, 2002), aumento na produção de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (FHDE) (Harder e Couson, 1979), estimula a produção de prostaciclina (PGI₂) (Sylvester et al., 1985; Gordon et al., 1986; Kauser e Rubanyi, 1997; Gonzales e Kanagy, 1999; Gonzales et al. 2001), aumenta a produção de angiotensina II (Tostes et al., 2003) e a expressão do receptor de angiotensina AT1 (Takeda et al., 2002). Em relação aos efeitos promovidos pelo estrogênio no músculo liso vascular, alguns estudos mostraram que este hormônio inibe os canais de Ca⁺⁺ voltagem-dependentes (Farhat et al., 1996; Freay et al., 1997; Lahm et al., 2007) e estimula os canais de K⁺ (Valverde et al., 1999). Como visto, o estrogênio atua sobre a vasculatura promovendo vasodilatação e, como já descrito na literatura, sua deficiência promove efeitos opostos (Hashimoto et al., 1995; Kawano et al., 1996; English et al., 1998). Entretanto, alguns estudos sugerem que o estrogênio possui ação angiogênica (Spyridopoulos et al., 1997), modulando a expressão do receptor KDR de fatores de crescimento endoteliais vasculares (VEGF) (Hyder et al., 2000; Gargett et al., 2001). Devido ao fato da HAP apresentar proliferação endotelial vascular associada a um aumento da expressão de VEGF, o estrogênio pode atuar exacerbando a doença vascular pulmonar. Além disso, foi demonstrado por Agrawal et al. (2000) que a terapia de reposição hormonal eleva os níveis de VEGF em mulheres pós-menopausais.

Em relação a fisiopatogenia da HAP, como existem diversos mecanismos, celulares e moleculares envolvidos, 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 de doença, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos podem variar de acordo com a fase evolutiva (Rubin et al., 2004).

O endotélio vascular possui um importante papel na fisiopatogenia da HP devido a relevância de seu envolvimento no processo vaso-oclusivo propriamente dito (Larumbe e Escoboza, 1994). As células endoteliais podem responder de diferentes maneiras às

diversas injúrias, como hipóxia, estresse de cisalhamento, inflamação, toxinas ou drogas, resultando em proliferação endotelial anormal e posteriormente na formação de lesões plexiformes (Cool et al., 1999). Em relação à hipóxia, apesar de não ser um dos principais fatores para o desenvolvimento inicial da HAP, ela pode contribuir para o remodelamento vascular pulmonar durante a progressão da doença (hipóxia crônica) e/ou causar vasoconstrição pulmonar (hipóxia aguda) (Hardingham et al., 1997; Sweeney e Yuan, 2000). Entretanto, também ocorrem alterações das funções homeostáticas endoteliais, tais como as vias de coagulação e produção de fatores de crescimento e agentes vasoativos (Lee et al., 1998). Estudos prévios demonstraram um aumento na produção de tromboxano e uma diminuição na formação de PGI₂ em pacientes com HAP (Christman et al., 1992); redução da expressão da PGI₂ sintase em arteríolas pulmonares (Tuder et al., 1999); redução da expressão da ON-sintase (McQuillan et al., 1994; Giadid e Saleh, 1995); aumento da expressão de ET-1 (Giaid et al., 1993; Davie et al., 2002); aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de seus receptores pulmonares (Cool et al., 1999; Taraseviciene-Stewart et al., 2001); e um aumento do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Hirose et al., 2000). Estas alterações levam a um aumento do tônus vascular, resultando em um aumento da pressão arterial pulmonar e conseqüentemente provoca maior dano endotelial. Também pode estar presente na HAP uma redução da expressão dos (BMPR2), mais precisamente mutações do gene que o codifica e que está localizado no cromossomo 2q33 (Deng et al., 2000; Lane et al., 2000) acarretando deficiência de mecanismos antiproliferativos na circulação pulmonar (Atkinson et al., 2002); Outra alteração que pode estar presente na HAP e que também está associada a vasoconstrição e proliferação das células musculares lisas é o aumento das concentrações de serotonina (Hervé et al., 1995; MacLean, 2000), devido, em parte, ao aumento de seu transportador (5-HTT) (Eddahibi et al., 2001). Por outro lado existem importantes evidências de que mecanismos inflamatórios também estão envolvidos com a HAP, pois já foi observado infiltrado inflamatório em vasos pulmonares, composto por macrófagos e linfócitos T e B (Tuder et al., 1994; Dorfmueller et al., 2003; Nicolls et al., 2005). Estudos

recentes demonstraram que os canais de K^+ (Kv1.5 e Kv2.1) apresentam sua expressão reduzida, tanto em modelos experimentais quanto em humanos com HAP, provavelmente devido à hipóxia. Com isso há um favorecimento do influxo de Ca^{++} e inibição das caspases, resultando em proliferação celular, vasoconstrição e inibição da apoptose (Yuan, 1998; Michelakis et al., 2002; Remillard e Yuan, 2004; McMurtry et al., 2004; Guignabert et al., 2006; Young et al., 2006).

Considerando-se os achados clínicos da HAP, um dado importante se refere às adaptações do VD induzidas pelo aumento da pós-carga ventricular, que leva a um aumento da pressão sistólica do VD. Em longo prazo estas alterações acarretam hipertrofia ventricular direita, e conseqüentemente redução da fração de ejeção e do volume diastólico final, que pode resultar em redução do débito cardíaco (Chen et al., 1998; Szabo et al., 2006). Em consequência a este aumento crônico de pós-carga, o ventrículo direito dilata-se, aumenta a demanda miocárdica de oxigênio e simultaneamente reduz a perfusão do VD, comprometendo ainda mais a contratilidade (Bogaard et al., 2009). Embora o ventrículo esquerdo (VE) não seja diretamente comprometido, a progressiva dilatação do VD pode prejudicar seu desempenho devido às interações com o septo interventricular (Louie et al., 1995; Nootens et al., 1995).

Vários investigadores têm procurado estudar os mecanismos fisiopatológicos da HAP. Temos observado que a maioria destes estudos são realizados em humanos, embora existam vários modelos experimentais para a indução da HAP. Estes estudos experimentais, que na grande maioria das vezes é realizado em machos tem mostrado as alterações morfofuncionais da HAP, porém uma avaliação dos mecanismos funcionais que possivelmente estão alterados em relação aos sistemas cardiovascular e respiratório permanecem por serem esclarecidos em fêmeas. Desta forma, um dos objetivos deste estudo foi caracterizar, em fêmeas ooforectomizadas e intactas, estas alterações funcionais no modelo experimental de HAP induzida pela monocrotalina (MCT), a fim de que os mecanismos fisiológicos envolvidos possam ser evidenciados, uma vez que alguns

parâmetros relatados nos estudos em humanos não necessariamente se aplicam ao modelo experimental, como por exemplo, as manobras de esforço respiratório.

Modelos experimentais para indução de doenças cardiopulmonares têm sido extensivamente relatados na literatura científica, fornecendo informações úteis referentes ao entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que irão tipificar as diversas doenças, tais como: a bronquite (Nikula e Green, 2000); a asma (Drazen et al., 1999); a doença pulmonar obstrutiva crônica (Fehrenbach, 2003); a enfisema pulmonar (March et al., 2000); e a fibrose intersticial e infecções pulmonares (Reichart et al., 1992). Considerando-se o elevado índice de mortalidade em pacientes com HAP (Rubin, 1997; Rich, 2006; Bogaard et al., 2008), 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 modelos experimentais de HP mais comumente utilizados são os modelos de hipóxia crônica e os modelos de MCT (Stenmark et al., 2009).

A MCT é um alcalóide inativo obtido das sementes da *Crotalaria spectabilis* sendo transformado no alcalóide tóxico, o pirrol da MCT (MCTP), no fígado (Yuyama et al., 2004). Apesar da resposta à MCT variar entre espécies de animais devido as diferenças existente do metabolismo hepático pelo citocromo P-450, a espécie preferida para estudar a HP é o rato (Stenmark et al., 2009). Vários trabalhos mostraram em ratos que a MCT, através de uma injeção subcutânea ou intraperitoneal única em ratos, provoca lesões na vasculatura pulmonar que resulta em HAP e hipertrofia/falência do VD, sem afetar a função do VE (Morita et al., 1996; Nakazawa, et al., 1999; Ito et al., 2000). Apesar deste modelo experimental ser utilizado desde 1961 (Wilson et al., 1992), o mecanismo exato pelo qual a MCT provoca a HAP ainda é desconhecido. Sugere-se lesão endotelial vascular direta (Jasmin et al., 2001) e inflamação dos vasos pulmonares (Farhat et al., 1993), levando a um aumento da resistência arterial pulmonar e hipertrofia de VD. As lesões vasculares pulmonares induzidas pela MCT são semelhantes aquelas observadas na HAP, sugerindo

que a HAP deste modelo pode representar a melhor forma de avaliar a correlação entre disfunção endotelial e hipertrofia/falência do VD (Palevsky et al., 1989).

O desenvolvimento da HAP induzida pela MCT difere entre os sexos em ratos (Kiyatake et al., 1992); nas fêmeas o desenvolvimento da doença parece ser atenuado, como demonstrado por Tofovic et al. (2005). Apesar dos vários estudos já realizados, as alterações cardiovasculares e respiratórias assim como as autonômicas observadas neste modelo de HAP também permanecem por serem esclarecidas.

A regulação da pressão arterial (PA) é o resultado da ativação de vários 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 SNC. As aferências provenientes dos barorreceptores arteriais dirigem-se para o SNC, e deste partem eferências autonômicas para o coração e vasos sanguíneos, constituindo-se em um mecanismo de retroalimentação, que permite a regulação da PA batimento a batimento (Jacob e cols., 1986, 1988).

Em condições normais, a pressão arterial média é mantida dentro de estreitos limites de variações, assegurando uma adequada perfusão para os tecidos. Para isso, as variáveis hemodinâmicas, tais como débito cardíaco e resistência periférica são continuamente ajustadas por estes mecanismos, a fim de manter a pressão arterial com o menor valor de variação possível (Spyer, 1990).

Dos mecanismos neurais de regulação da PA, o barorreflexo é o mais estudado (Irigoyen e Krieger, 1998). Tal reflexo promove sua ação por meio de mecanorreceptores localizados na camada adventícia do arco aórtico e do seio carotídeo (Kunze, 1984). Estes

receptores são sensíveis às alterações de tensão produzidas 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 para o SNC por meio de aferências barorreceptoras que caminham juntamente com os nervos vago e glossofaríngeo. Quando ocorre um aumento súbito de PA, a consequente 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 conseqüentemente, uma diminuição do débito cardíaco e da PA. Em contrapartida, a queda de PA é compensada por um decréscimo na descarga aferente barorreceptora, promovendo alterações exatamente opostas às acima citadas para o componente autonômico (Brown, 1980; Michelini, 1989).

Um outro reflexo cardiovascular que desempenha importante função no controle da PA é o reflexo Bezold-Jarisch (RBJ), um epônimo para a tríade de respostas cardiorrespiratórias (apnéia, 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, frequência 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 pulmonares (Kappagoda et al., 1972; Thorén, 1980). São receptores de baixa pressão, sendo mais sensíveis às mudanças de pressão diastólica final do VE, diferentemente dos barorreceptores aórticos e carotídeos que são receptores de alta pressão.

Os receptores sensoriais do RBJ constituem-se de terminações mecano- e quimio-sensitivas, sendo facilmente estimulados quimicamente por injeções de 5-hidroxitriptamina

(5-HT) ou fenilbiguanida (FBG) (Meyrelles et al., 1994; Mark e Mancia, 1994; Ustinova e Schultz, 1994).

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 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 HAP experimental em fêmeas. Assim, o presente estudo se justifica por ser a HAP uma das doenças vasculares mais graves, com alto índice de mortalidade, além de acometer mais o sexo feminino, e pela escassez em literatura, de pesquisas experimentais referentes aos sistemas cardiovascular tônico e reflexo, assim como o respiratório.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral:

- ✓ Estudar os efeitos promovidos pela hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida pela MCT sobre o sistema cardiovascular e respiratório de ratas ooforectomizadas e não ooforectomizadas e com cirurgia fictícia (SHAM).

Específicos:

- ✓ Avaliar as alterações hemodinâmicas decorrentes da HAP induzida por MCT em ratas ooforectomizadas e SHAM;
- ✓ Avaliar os efeitos da HAP induzida por MCT sobre o sistema respiratório e gasométrico de ratas ooforectomizadas e SHAM;
- ✓ Avaliar os efeitos da HAP induzida por MCT sobre os componentes autonômicos cardíacos de ratas ooforectomizadas e SHAM;
- ✓ Avaliar as respostas cardiovasculares reflexas (Barorreflexo e Reflexo Bezold-Jarisch) de ratas com HAP induzida pela MCT ooforectomizadas e SHAM;
- ✓ Estudar as alterações anatomopatológicas da vasculatura pulmonar de ratas portadoras de HAP, induzida pela MCT, ooforectomizadas e SHAM.

MATERIAL E MÉTODOS

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 do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

2.0 – Animais Experimentais

Foram utilizadas ratas *Wistar* provenientes o Biotério Central da UFES, com peso padronizado entre 200-220g, divididas em 4 grupos: grupo controle (CON), grupo monocrotalina (MCT), grupo ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado + monocrotalina (OVX+MCT). Os animais foram mantidos em caixa de polipropileno, com controle de claro/escuro (12/12h), com livre acesso à água e à ração balanceada. Todos os experimentos foram desenvolvidos respeitando-se a normas de proteção aos animais da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.0 - Tratamento dos animais para indução da HAP

A HAP experimental foi induzida através de uma única aplicação de MCT (Crotaline; Sigma Chemical Co), injetada de forma subcutânea, na dose de 60 mg/Kg/mL. Para tanto, a MCT foi inicialmente dissolvida em 1 N de ácido clorídrico (HCL). A seguir, o pH foi corrigido para 7,4 com solução de NaOH 0.5 N. Uma vez dissolvido, o volume da solução foi ajustado para 7 mL com salina. Nos grupos experimentais submetidos à HAP, os experimentos iniciaram-se 4 semanas após a aplicação da MCT; período necessário para a sua instalação. Os grupos controle para HAP e ooforectomia (CON e OVX, respectivamente)

receberam uma injeção subcutânea de salina com volume equivalente ($\approx 0,7$ ml) 4 semanas antes do início dos experimentos.

4.0 - Castração dos animais (Ooforectomia)

Após anestesia com hidrato de cloral (10% IP), as ratas foram submetidas a uma incisão cirúrgica na pele de aproximadamente 1,5 cm na região dorsal, entre a última costela e a coxa, a 1 cm da linha mediana. A seguir, a cavidade abdominal foi aberta para permitir a ligadura da tuba uterina e retirada dos ovários (ooforectomia bilateral). Ao final, foi feita a sutura da musculatura e pele. A ooforectomia foi realizada 10 dias antes do tratamento com MCT ou salina.

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 1^a, 2^a, 3^a e 4^a semanas. Desta forma, os animais submetidos à ooforectomia tiveram este procedimento realizado 10 dias antes do tratamento com salina ou MCT.

5.0 – Registro pletismográfico de corpo inteiro

A técnica de pletismografia de corpo inteiro é um método utilizado para registro respiratório dos animais sem a utilização de anestésico e consiste de uma câmara acrílica, transparente, hermeticamente fechada, com volume de 2.095 ml, onde o animal é colocado (Figura 1). Esta câmara era conectada a um transdutor de alta sensibilidade (modelo 270 – medical group HEWLETT PACKARD RANGE 4002^o 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 do volume corrente, bem como da frequência respiratória. A calibração do sistema foi realizada 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 promover as alterações de pressão dentro da câmara, as quais foram utilizadas nos cálculos dos volumes respiratórios.

Os registros foram iniciados após um período de aproximadamente 10 a 15 minutos para adaptação do animal à câmara pletismográfica. Foram realizados 5 períodos de registros por animal, sendo que cada um teve a duração de 5 minutos. Entre estes períodos de registro a câmara foi aberta e assim permanecendo por 1 minuto, para permitir a renovação do ar da mesma. Para as análises dos dados não foram utilizados os 2 primeiros registros, uma vez que nestes, o animal encontrava-se em fase de adaptação na câmara. (Mauad et al., 1992). Os seguintes grupos foram estudados: CON (N=9), MCT (N=9), OVX (N=9) e OVX+MCT (N=8).

5.1– Cálculo dos parâmetros ventilatórios

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

$$V_C = VK \cdot \frac{\Delta PT}{\Delta PK} \cdot \frac{T^{\circ}C}{T^{\circ}a} \cdot \frac{Pb - P_{cH_2O}}{(Pb - P_{cH_2O}) - \frac{T^{\circ}C}{T^{\circ}P} \cdot (Pb - P_{PH_2O})}$$

Onde:

V_C = volume de ar corrente (unidade = mL)

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

ΔPT = variação de pressão dentro da câmara, na presença do animal. Este valor foi obtido a partir dos registros impressos em papel 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 realizada uma média aritmética de aproximadamente 10 inspirações ou expirações.

ΔPK = 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.

$T^{\circ}C$ = temperatura da câmara em $^{\circ}K$ obtida no momento do registro, após a adaptação do animal (foi colocado um termômetro na parede interna da câmara).

$T^{\circ}a$ = temperatura ambiente em $^{\circ}K$ (termômetro localizado na sala de registro).

$T^{\circ}P$ = temperatura do pulmão do animal em $^{\circ}K$ (311 $^{\circ}K$, Bartlett, 1971).

P_b = pressão barométrica (unidade = TORR).

P_{cH_2O} = pressão de vapor de água na câmara determinada em tabela a partir da $T(^{\circ}C)$ da câmara (unidade = TORR).

PPH_2O = pressão de vapor de água dos pulmões do animal determinada a partir da $T(^{\circ}C)$ dos pulmões (unidade = TORR).



Figura 1 – Câmara Pletismográfica

5.2– Fator de correção

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

$$\text{Fator de Correção} = \frac{\text{VC} - \text{Vrato}}{\text{VC}}$$

$$\text{VOLUME CORRENTE CORRIGIDO} = \text{Fator de Correção} \cdot \text{V}_c$$

Onde:

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

Vrato= peso do animal (unidade: gramas).

5.3 – Outras variáveis ventilatórias calculadas

- Frequência Respiratória (FR): calculada a partir dos registros ventilatórios. Foi calculada a média aritmética de 3 períodos de registros. Expressa em ciclos por minuto (cpm).
- Volume-minuto (Vmin): calculado pelo produto entre o volume corrente e a frequência respiratória.
- Espaço morto (E_M) = 0,5 mL (Jalde et al., 2010)
- Ventilação alveolar (V_A): calculada pela seguinte fórmula = $(VC - EM) \cdot FR$

6.0 – Cateterização da artéria e veia femoral

Sob anestesia por hidrato de cloral (10% IP), os animais foram submetidos ao implante de um cateter na aorta abdominal, acessada através da artéria femoral esquerda, para permitir os registros cardiovasculares. Também foi inserido um cateter 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 uma 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, os cateteres foram

heparinizados (Liquemine, Roche, Rio de Janeiro, Brasil) (1:50) para evitar a formação de coágulos durante o período de registros.

7.0 – Registros direto da pressão arterial e da frequência cardíaca

Para os registros da Pressão Arterial Pulsátil (PAP), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC), o cateter foi conectado a um transdutor de pressão conectado a um Sistema de Aquisição de Dados computadorizado (PowerLab) acoplado a um computador. A frequência de amostragem foi fixada em 100 Hz. Para visualização dos registros e análise dos dados foi utilizado o software Chart V4.2 (PowerLab® ADInstruments, USA).

8.0 - Avaliação dos componentes autonômicos

O bloqueio autonômico foi realizado com a finalidade de avaliarmos os efeitos dos tratamentos (MCT e ooforectomia) sobre os componentes simpático e parassimpático cardíaco, bem como para auxiliar no entendimento das alterações cardiovasculares observadas.

Para tanto foram realizadas injeções do antagonista β_1 -adrenérgico atenolol (2 mg/Kg/mL, IV) e do antagonista muscarínico metil-atropina (2mg/Kg/ml, IV). As alterações na FC basal foram analisadas antes e 15 minutos após cada bloqueio. A avaliação do componente simpático foi realizada 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.

Estes registros foram realizados com os animais acordados, adaptados à sala de registro e 24 horas após o procedimento de cateterização da artéria e veia femorais. Os

seguintes grupos foram submetidos aos bloqueios autonômicos: CON (N=8), MCT (N=9), OVX (N=9) e OVX+MCT (N=4).

9.0 - Avaliação das Pressões Ventriculares

Para avaliarmos as pressões ventriculares, os animais foram submetidos à anestesia com hidrato de cloral (10% IP) e ao cateterismo da veia jugular e artéria carótida para permitir a medida direta das pressões das câmaras cardíacas direita e esquerda, respectivamente.

O registro das pressões ventriculares foi realizado individualmente. Inicialmente, para a medida da pressão do ventrículo direito (VD), um tubo de polietileno (PE-50) que foi introduzido na veia jugular direita através de um pequeno orifício. A seguir o cateter foi conduzido manualmente até o VD.

Para a medida da pressão do ventricular esquerda (VE) outro cateter (PE-50) foi introduzido na artéria carótida direita, também através de um pequeno orifício até alcançar o VE.

Uma vez nos ventrículos, os cateteres foram conectados a um transdutor de pressão, posicionados na altura do tórax do animal e conectados a um Sistema de Aquisição de Dados computadorizado (PowerLab), a uma frequência de amostragem de 100 Hz. A posição do cateter foi confirmada pela morfologia das ondas observadas na tela do monitor (*on line*) utilizando o software Chart V4.2 (PowerLab® ADInstruments, USA).

Foram mensuradas as seguintes pressões ventriculares: pressão ventricular sistólica máxima (PSmax), pressão ventricular diastólica inicial (PDI), pressão ventricular diastólica final (PDF). Foi utilizada a média aritmética de 10 traçados de onda, cujos valores foram obtidos através do software Chart V4.2 acima citado. A avaliação das pressões ventriculares

foi realizada nos seguintes grupos: CON (N=10), MCT (N=10), OVX (N=10) e OVX+MCT (N=10).

10.0 – Avaliação dos Reflexos Cardiovasculares

10.1 – Avaliação do Barorreflexo

Com o objetivo de avaliarmos a função barorreflexa, os grupos CON (n=8), MCT (n=9), OVX (n=9) e OVX+MCT (n=4) tiveram as artérias e veia femorais cateterizadas 24 horas antes do registro conforme descrito no item 6.0. No dia dos registros, após um período de 15 minutos para adaptação à sala de registro, os experimentos foram iniciados. A avaliação do barorreflexo foi realizada através de uma infusão contínua, por meio de bomba de infusão (Havard, 600-900, 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 obtermos uma elevação ou diminuição da PAM de 50 mmHg em relação à linha base. Posteriormente, os valores de FC correspondentes às alterações de PAM foram tomados em intervalos de 10 em 10 mmHg e os valores de bradicardia e taquicardia reflexas foram anotados. 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 e adaptado por Head e McCarty (1987), conforme fórmula abaixo:

$$FC = Pb + (Pt - Pb) / [1 + \exp(-4,56 \cdot G) / (Pt - Pb) \cdot (PA_{50} - PAM)]$$

Onde:

FC = frequência cardíaca

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

P_t = platô de taquicardia, que indica a resposta máxima de aumento da FC induzida pelo acréscimo da pressão arterial

P_t-P_b = corresponde a amplitude, isto é, a 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 melhor visualizados na Figura 2, onde representamos um modelo de curva sigmoidal barorreflexa.

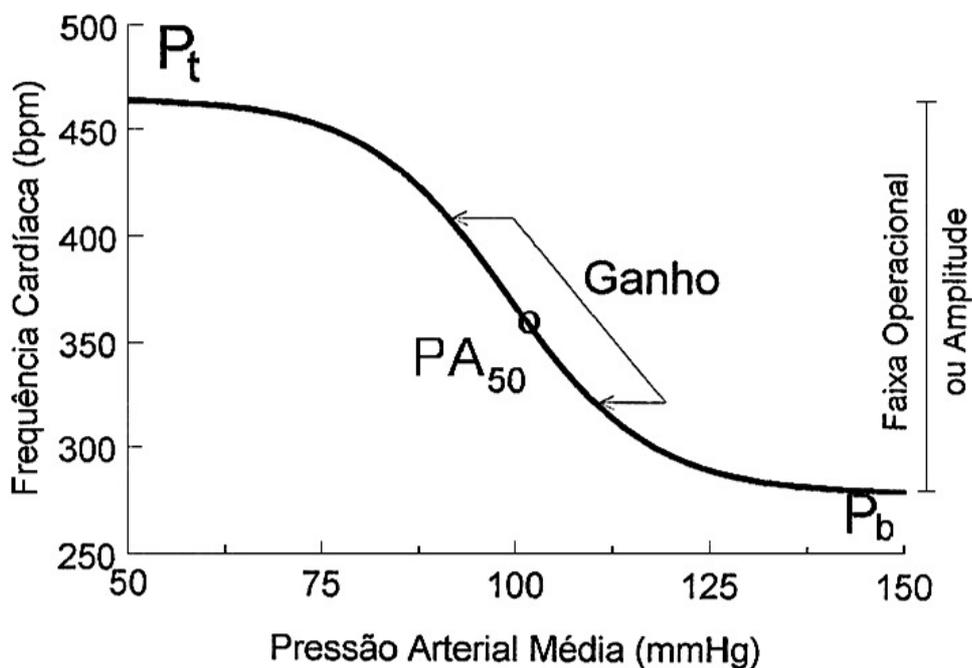


Figura 2 – Modelo da curva sigmoidal barorreflexa

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

$$PDLS = (R.(((((-4,56.G)/R.exp((-4,6.G)/R.(x-PA50)))/((1+exp((-4,6.G)/R.(x-PA50)))^2))))$$

10.2 – Avaliação do Reflexo de Bezold-Jarisch (RB-J)

Para avaliarmos o Reflexo de Bezold-Jarisch, os animais dos 4 grupos estudados, isto é, CON (N=8), MCT (N=9), OVX (N=9) e OVX+MCT (N=4) tiveram a artéria e veia femorais cateterizadas 24 horas antes do registro. No dia dos registros cardiovasculares, após um período de 15 minutos para adaptação à sala de registro, os experimentos foram iniciados. O RB-J 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 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).

11.0 – Avaliação gasométrica

Após os registros de pressão ventricular, foi retirada uma pequena amostra de sangue (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: PaCO₂ (pressão parcial arterial de dióxido de carbono), PaO₂ (pressão parcial arterial de oxigênio), HCO₃⁻ (bicarbonato), pH (potencial hidrogeniônico) e Sat Hb (saturação de hemoglobina), nos 4 grupos estudados.

12.0 - Determinação dos pesos seco e úmido dos ventrículos

As câmaras cardíacas (ventrículos direito e esquerdo) e útero foram retirados no final dos experimentos, pesados em balança de precisão (AND-GR-200) e corresponderam ao peso úmido. A seguir, apenas as câmaras cardíacas foram mantidas em estufa a 100°C por

24 horas e novamente pesados. Estes valores corresponderam ao peso seco dos ventrículos. Foi registrado o peso úmido ao final do experimento, bem como o peso seco (somente das câmaras cardíacas), após 24 horas do tecido em estufa a 100°C para desidratação.

12.1 – Determinação do Índice Pulmonar

A hipertrofia ventricular direita foi avaliada através da determinação do Índice de Fulton ou Índice Pulmonar. Segundo Fulton et al. (1952), na separação das câmaras cardíacas, o VD deve ser isolado do VE e septo, sendo que estes últimos formam um único conjunto. Desta forma, este índice é calculado pela razão entre o peso seco do VD e o peso seco do VE + septo, ambos corrigidos pelo peso corporal, ou seja, g/100g. Este índice tem sido utilizado em vários estudos de HAP (Al-Ansari et al., 2007).

13.0 – Histologia Pulmonar

Os pulmões (CON=4, MCT=4, OVX=4 e OVX+MCT=4) foram retirados e fixados em formol tamponado a 10% por perfusão passiva através de uma coluna de altura de 50 cm. Foram realizados cortes transversais do lobo médio do pulmão esquerdo e os mesmos acondicionados em cassete, desidratados em etanol e incluídos em parafina para microtomia. Posteriormente foram realizados cortes de 6 micrômetros e corados com hematoxilina/eosina (HE). As imagens foram capturadas em microscópio trinocular ZEISS AXIOSTAR acoplado a câmara digital MDC200.

As imagens foram capturadas com objetivas de 5x, 10x e 40x. Foram tomados aleatoriamente 6 campos microscópios de 5 e 40x para avaliar a morfometria dos ramos das artérias pulmonares. A espessura da parede, diâmetro externo (2x a espessura da parede + lúmen) e o diâmetro do lúmen, foram tomadas diretamente as fotomicrografias com auxílio

de um paquímetro. A unidade de medida do paquímetro foi convertida em μm através de fotomicrografia de uma escala com os mesmos aumentos (5x e 40x) das fotomicrografias do pulmão. Para avaliarmos a espessura da parede vascular foram utilizados os valores, em μm , tomados das fotomicrografias de 40x. Entretanto, estes valores de espessura e lúmen foram corrigidos pelo valor do diâmetro externo dos vasos.

A contagem de vasos pulmonares terminais muscularizados junto aos sacos alveolares foi feita diretamente em fotomicrografias tomadas com objetiva de 5x. Foram contados ramos arteriais que apresentaram a muscular evidente.

14.0 - Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Os métodos estatísticos utilizados foram: análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, com análise *pos-hoc* pelo teste Fisher LSD. As diferenças estatísticas foram fixadas como sendo significativas para $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$.

15.0 - Drogas e substâncias utilizadas

- 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%)
- Formol tamponado a 10%
- Hematoxilina-eosina

RESULTADOS

RESULTADOS

1.0 – PESO CORPORAL

Na figura 3 apresentamos o peso corporal dos animais dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado + monocrotalina (OVX+MCT). Seus pesos corporais foram registrados no início do tratamento (dia 0) e ao final da 4ª semana, após a injeção de salina ou monocrotalina. Inicialmente podemos observar que não houve diferenças significativas entre os grupos CON e MCT entre as 4 semanas estudadas. Podemos observar também que o grupo OVX apresentou pesos corporais significativamente maiores que o grupo CON da 1ª a 4ª semana. Observamos ainda que o grupo OVX+MCT apresentou pesos corporais significativamente menores que o seu respectivo grupo controle (OVX). Ao final da 4ª semana, os animais do grupo OVX+MCT apresentaram o peso corporal menor quando comparado ao grupo OVX ($243 \pm 7^{**}$ vs 296 ± 6 g, respectivamente $**p < 0,01$) e este por sua vez apresentou peso corporal maior que o grupo CON ($296 \pm 6^{##}$ vs 234 ± 5 g, respectivamente, $##p < 0,01$).

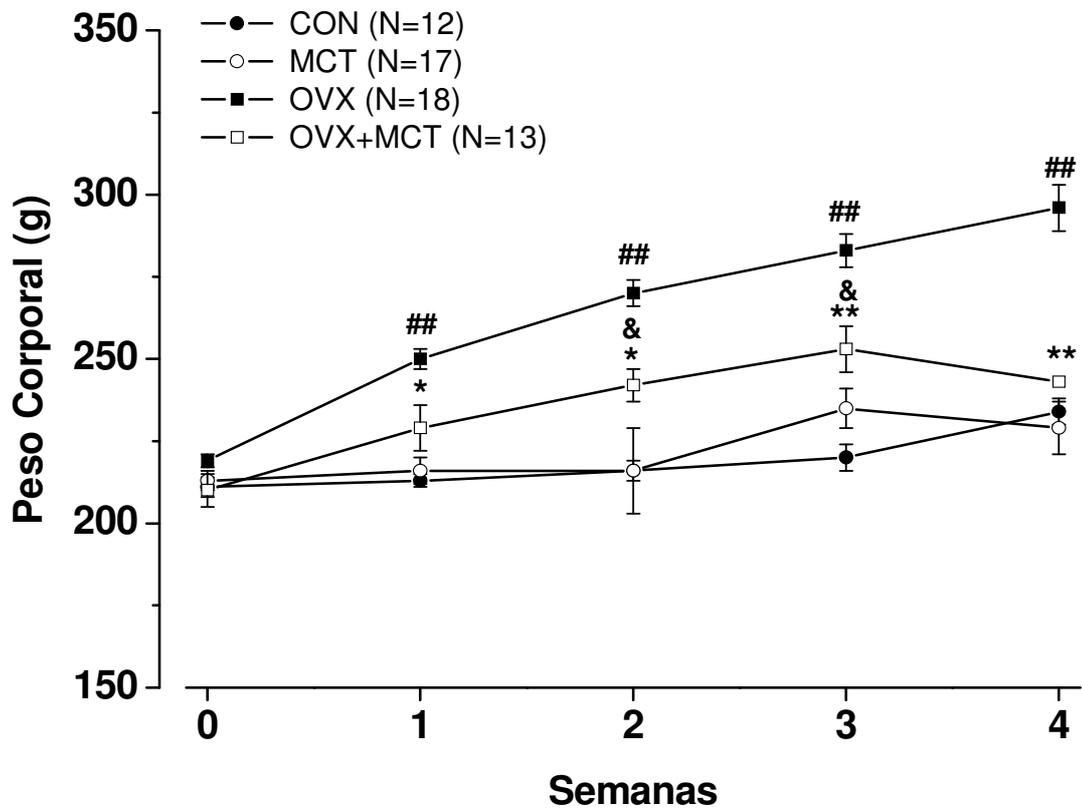


Figura 3 – Peso corporal dos grupos de animais ao início e após 4 semanas de em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON. ## $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. & $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

2.0– PESO DO ÚTERO

Na figura 4 apresentamos os valores de peso do útero corrigido pelo peso corporal dos grupos CON (n= 12), MCT (n= 17), OVX (n= 18) e OVX+MCT (n= 13). Podemos observar inicialmente que não houve diferença significativa entre o grupo MCT e CON ($0,235\pm 0,01$ vs $0,229\pm 0,08$ mg/100g, respectivamente). Podemos observar também que houve uma redução significativa do peso do útero no grupo OVX em relação ao grupo CON ($0,039\pm 0,02^{##}$ vs $0,229\pm 0,08$ mg/100g, respectivamente. $##p<0,01$) assim como do grupo OVX+MCT quando comparado ao grupo MCT ($0,045\pm 0,03^{\&\&}$ vs $0,235\pm 0,01$ mg/100g, respectivamente. $\&\&p<0,01$).

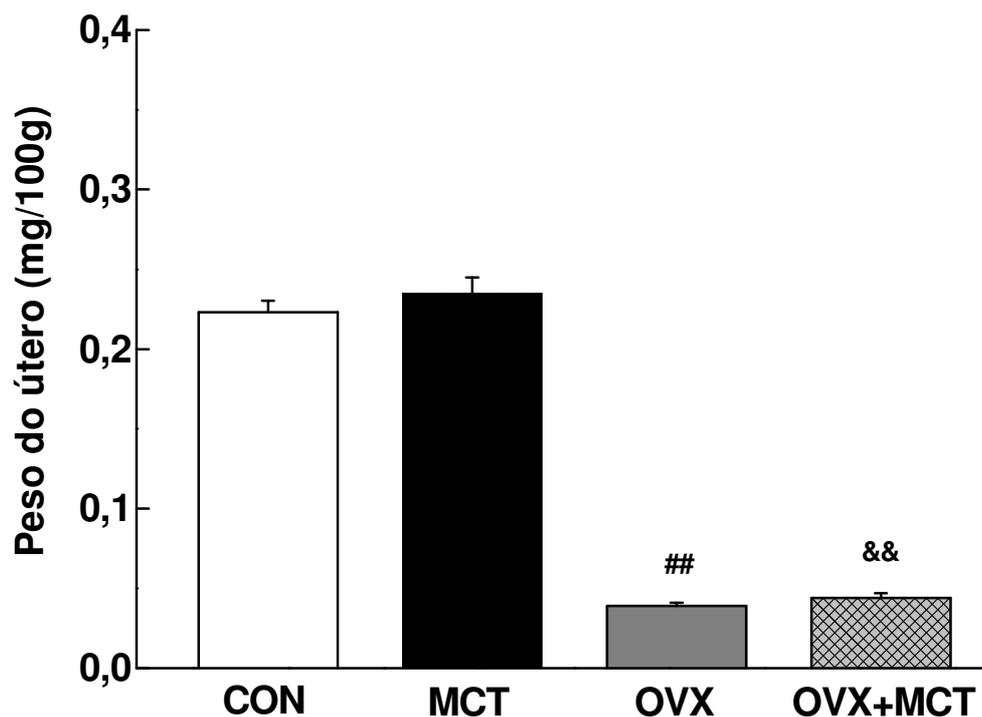


Figura 4 – Peso do útero corrigido em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). $##p<0,01$ indica diferença estatisticamente significante do grupo OVX em relação ao grupo CON. $\&\&p<0,01$ indica diferença estatisticamente significante do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

3.0 - PRESSÕES VENTRICULARES

3.1 - Pressão sistólica máxima do ventrículo direito .

Na figura 5 apresentamos os valores da pressão sistólica máxima (PSmax) do ventrículo direito (VD) dos animais do grupo CON (n=10), MCT (n=10), OVX (n=10) e OVX+MCT (n=10). Inicialmente, podemos observar um aumento significativo na PSmax do VD no grupo MCT em relação ao grupo CON ($45 \pm 2^{**}$ vs 26 ± 1 mmHg, respectivamente. $^{**}p < 0,01$), assim como do grupo OVX+MCT em relação ao grupo OVX ($50 \pm 2^{**}$ vs 30 ± 1 mmHg, respectivamente. $^{**}p < 0,01$). Aumentos significativos também foram observados da PSmax do grupo OVX em relação ao grupo CON ($30 \pm 1^{##}$ vs 26 ± 1 mmHg, respectivamente. $^{##}p < 0,01$).

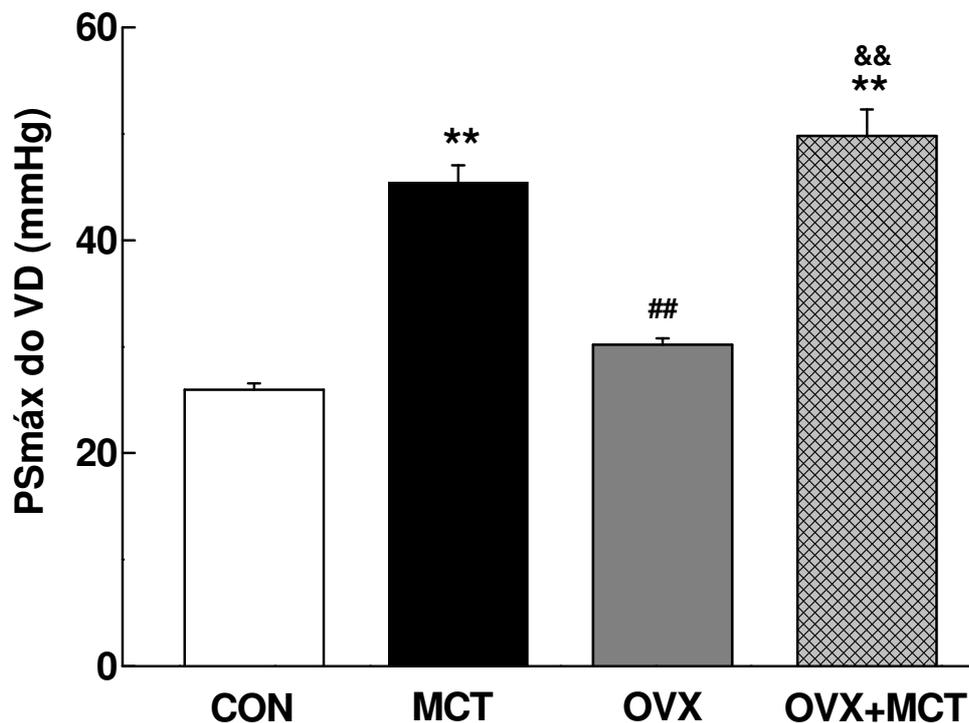


Figura 5 – Valores da Pressão Sistólica Máxima (PSmax) do ventrículo direito (VD) em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizados (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). $^{**}p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTS em relação ao respectivo grupo CON. $^{##}p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. $^{&&}p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

3.2 – Pressão diastólica do Ventrículo Direito e dP/dT

Na tabela I apresentamos os valores de pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF) e da derivada de pressão sobre o tempo (dP/dT) positiva (+) e negativa (-) do VD dos animais dos grupos CON (n=10), MCT (n=11), OVX (n=18) e OVX+MCT (n=10). Foram observados aumentos significativos na PDI no grupo MCT em relação ao seu grupo controle ($p<0,01$), assim como do grupo OVX+MCT em relação ao seu respectivo controle (OVX, $p<0,01$). O grupo OVX, por sua vez, apresentou valores significativamente menores que o grupo CON ($p<0,01$). Em relação à PDF observamos que os grupos MCT e OVX+MCT apresentaram valores significativamente maiores que os seus respectivos grupo controle ($p<0,05$), enquanto que o grupo OVX mostrou valores maiores se comparado ao grupo CON ($p<0,05$). Na avaliação da dP/dT (+) observamos que os grupos MCTs apresentaram valores significativamente maiores quando comparados aos seus respectivos grupos controles (CON, $p<0,05$; OVX $p<0,01$), assim como do grupo OVX comparado com grupo CON ($p<0,01$). Também foram observados valores mais negativos da dP/dT (-) nos grupos MCTs em relação aos respectivos grupos controles ($p<0,01$).

Tabela I – Valores da pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), dP/dT(+) e AP/dT(-) do VD dos animais dos grupos CON, MCT, OVX e OVX+MCT.

Parâmetros	GRUPOS			
	CON	MCT	OVX	OVX+MCT
PDI (mmHg)	-1,9 ± 0,3	0,1 ± 0,3**	-0,1 ± 0,1##	1,7 ± 0,2**&&
PDF (mmHg)	3,6 ± 0,5	6,0 ± 0,5**	4,8 ± 0,2#	8,1 ± 0,4**&&
dP/dT(+) (mmHg/s)	1.955 ± 87	2.416 ± 105*	1.678 ± 41##	2.365 ± 26**
dP/dT (-) (mmHg/s)	-1.340 ± 35	-1.818 ± 81**	-1.296 ± 22	-1.912 ± 42**

**p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação aos respectivos controles. #p<0,05 e ##p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. &&p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

3.3 - Pressão sistólica máxima do ventrículo esquerdo

Na figura 6 apresentamos os valores de pressão sistólica máxima (PSmax) do ventrículo esquerdo (VE) de animais dos grupos CON (n=9), MCT (n=10), OVX (n=10) e OVX+MCT (n=10). Inicialmente, podemos observar que não há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos MCT e CON (92 ± 3 vs 99 ± 1 mmHg, respectivamente), enquanto que o grupo OVX+MCT apresentou uma redução significativa ($97\pm 1^{**}$ vs 115 ± 3 mmHg, respectivamente. $^{**}p<0,01$). Também observamos um aumento da PSmax do grupo OVX quando comparado ao grupo CON ($115\pm 3^{\#}$ vs 99 ± 1 mmHg, respectivamente. $^{\#}p<0,05$).

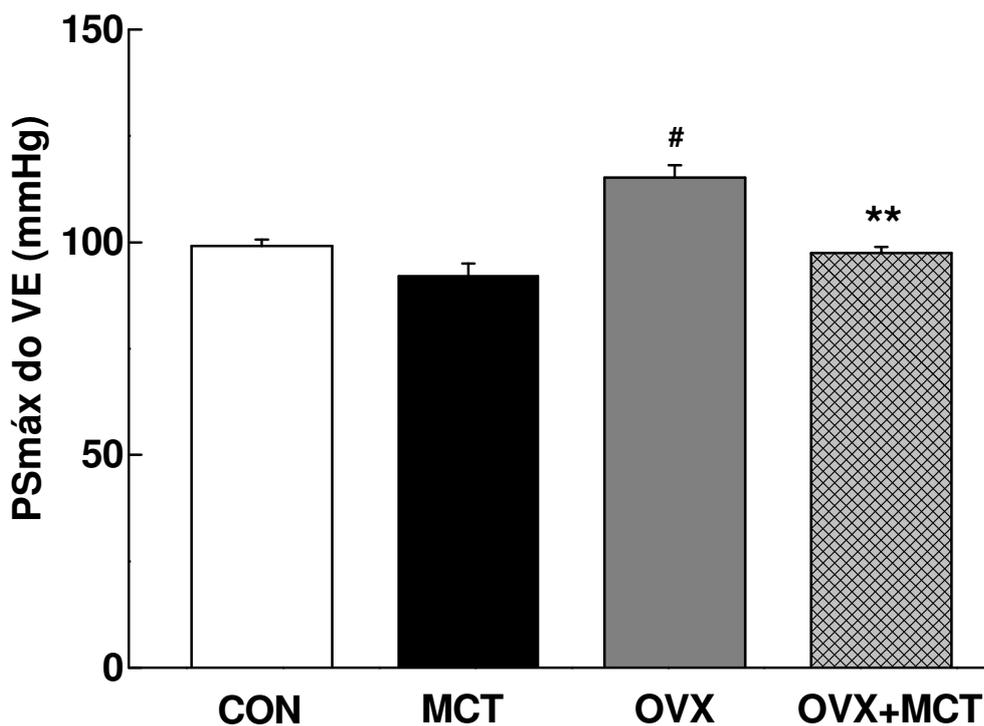


Figura 6 – Valores da Pressão Sistólica Máxima (PSmax) do ventrículo esquerdo (VE) em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizados (OVX) ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). $^{**}p<0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao OVX. $^{\#}p<0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON.

3.4 – Pressão diastólica de Ventrículo Esquerdo e dP/dT

Na tabela II apresentamos os valores da pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF) e da derivada de pressão sobre o tempo (dP/dT) positiva (+) e negativa (-) de VE dos animais dos grupos CON (n=9), MCT (n=6), OVX (n=13) e OVX+MCT (n=10). Podemos observar em relação a PDI inicialmente que não houve diferença significativa entre os grupos MCT e CON, enquanto que o grupo OVX+MCT foi significativamente maior que o seu respectivo grupo controle (OVX, $p<0,01$). Além disso, o grupo OVX foi significativamente maior que o grupo CON ($p<0,01$). Em relação a PDF, observamos aumento significativo apenas no grupo OVX em relação ao grupo CON ($p<0,01$). Na avaliação das dP/dT (+) e dP/dT (-) observamos inicialmente que os grupos MCTs não apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre eles. Porém, o grupo MCT apresentou valores significativamente maiores quando comparado ao grupo CON ($p<0,05$), enquanto que o grupo OVX apresentou valores significativamente menores quando comparado com grupo CON ($p<0,01$). Também foram observados valores significativamente mais negativos da dP/dT (-) no grupo MCT em relação ao grupo controle ($p<0,05$) e valores significativamente menos negativos no grupo OVX quando comparado ao grupo CON ($p<0,01$).

Tabela II - Valores da pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), dP/dT(+) e dP/dT(-) do VE dos animais dos grupos CON, MCT, OVX e OVX+MCT.

Parâmetros	GRUPOS			
	CON	MCT	OVX	OVX+MCT
PDI (mmHg)	0,6 ± 0,4	0,3 ± 0,5	-0,16 ± 0,6 ^{##}	2,4 ± 0,2 ^{**&&}
PDF (mmHg)	8,0 ± 0,7	6,9 ± 0,8	9,7 ± 0,5 ^{##}	10,4 ± 0,9
dP/dT(+) (mmHg/s)	6.630±104	5.552 ± 151*	5.715±124 ^{##}	5.611±141
dP/dT (-) (mmHg/s)	-6.456±65	-6.030 ± 444*	-5.223±157 ^{##}	-5.582±142

^{**}p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo OVX e ^{##}p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. ^{&&}p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

4.0 - PESOS ÚMIDO E SECO DE CORAÇÃO¹

Na figura 7 apresentamos os valores dos pesos úmido e seco corrigido pelo peso corporal do ventrículo direito dos animais dos grupos CON (n=12), MCT (n=14), OVX (n=14) e OVX+MCT (n=14). Inicialmente podemos observar um aumento significativo do peso úmido dos grupos MCTs em relação aos seus respectivos grupos controles. A saber, MCT vs CON ($0,95 \pm 0,04^{**}$ vs $0,51 \pm 0,02$ mg/100g, respectivamente. $^{**}p < 0,01$) (Figura 7A) e OVX+MCT vs OVX ($0,88 \pm 0,07^{**}$ vs $0,42 \pm 0,02$ mg/100g, respectivamente. $^{**}p < 0,01$). Alterações semelhantes foram observadas em relação ao peso seco. A saber, MCT vs CON ($0,24 \pm 0,01^{**}$ vs $0,13 \pm 0,004$ mg/100g respectivamente. $^{**}p < 0,01$), assim como um aumento significativo do grupo OVX+MCT em relação ao grupo OVX ($0,22 \pm 0,02^{**}$ vs $0,11 \pm 0,004$ mg/100g, respectivamente. $^{**}p < 0,01$) (Figura 7B).

Na figura 8 apresentamos os valores de peso úmido e seco corrigido pelo peso corporal do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos CON (n=12), MCT (n=14), OVX (n=)14 e OVX+MCT (n=14). Em relação ao peso úmido, podemos observar um aumento significativo do grupo OVX+MCT em relação ao grupo OVX ($236 \pm 12^{**}$ vs 195 ± 4 mg/100g, respectivamente. $^{**}p < 0,01$) (Figura 8A). Em relação ao peso seco, também observamos um aumento do VE do grupo OVX+MCT quando comparado ao grupo OVX ($57 \pm 3^*$ vs 51 ± 1 mg/100g, respectivamente. $^*p < 0,05$). Por outro lado, uma redução do grupo OVX+MCT foi observado quando comparado ao grupo MCT ($57 \pm 3^{\&}$ vs 64 ± 2 mg/100g, respectivamente. $^{\&}p < 0,05$) (Figura 8B).

Na figura 9 apresentamos os valores do Índice Pulmonar dos grupos CON, MCT, OVX e OVX+MCT. Podemos observar um aumento do Índice Pulmonar do grupo MCT em relação ao grupo CON ($0,36 \pm 0,01^{**}$ vs $0,23 \pm 0,001$ mg/100g respectivamente. $^{**}p < 0,01$), assim como do grupo OVX+MCT em relação ao grupo OVX ($0,38 \pm 0,02^{**}$ vs $0,21 \pm 0,007$ mg/100g, respectivamente. $^{**}p < 0,01$).

¹ Os valores absolutos dos pesos úmido e seco do VD e VE estão apresentados no apêndice 1.

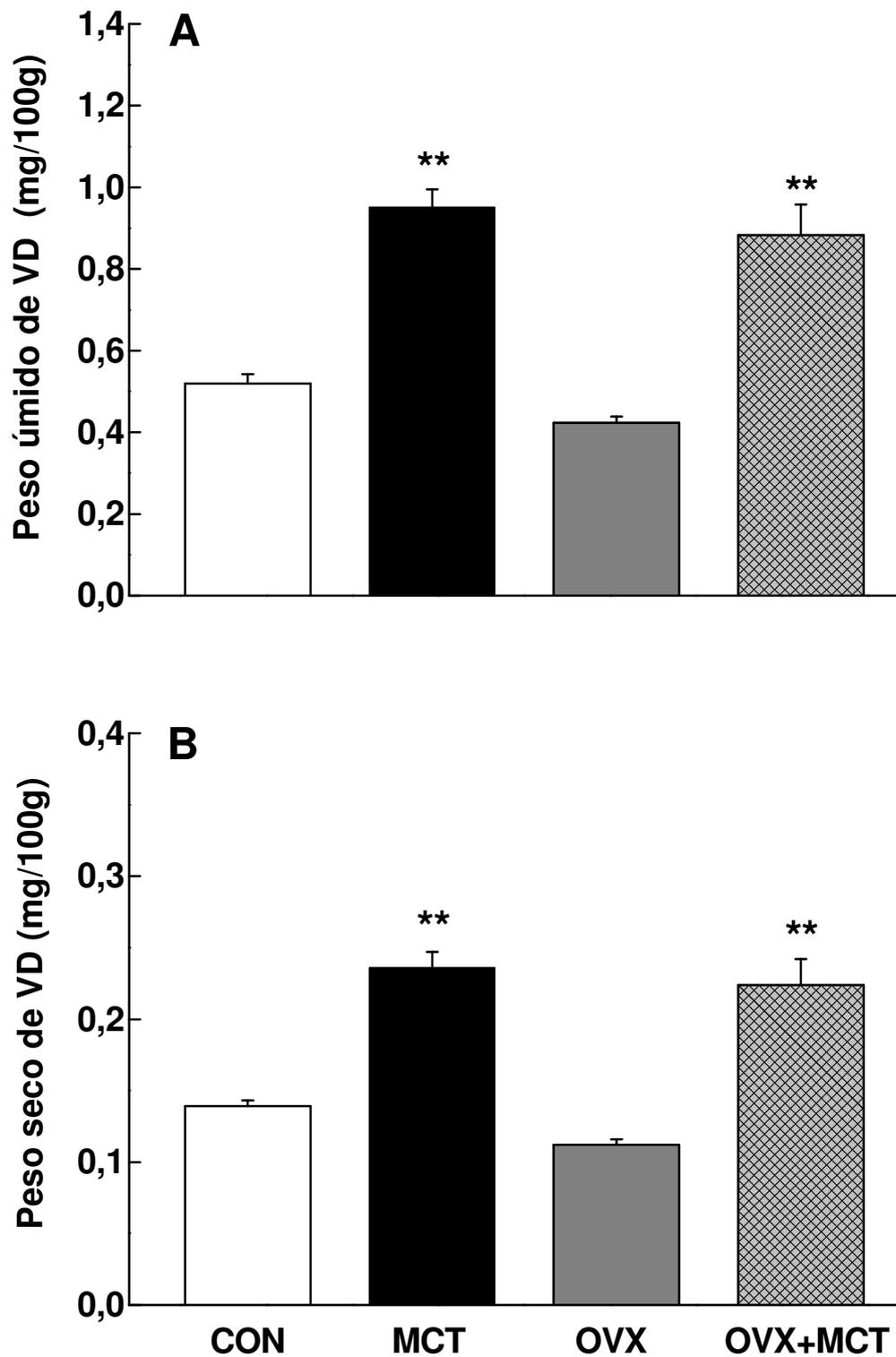


Figura 7 – Valores de peso úmido (A) e seco (B) de ventrículo direito em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizados (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao OVX.

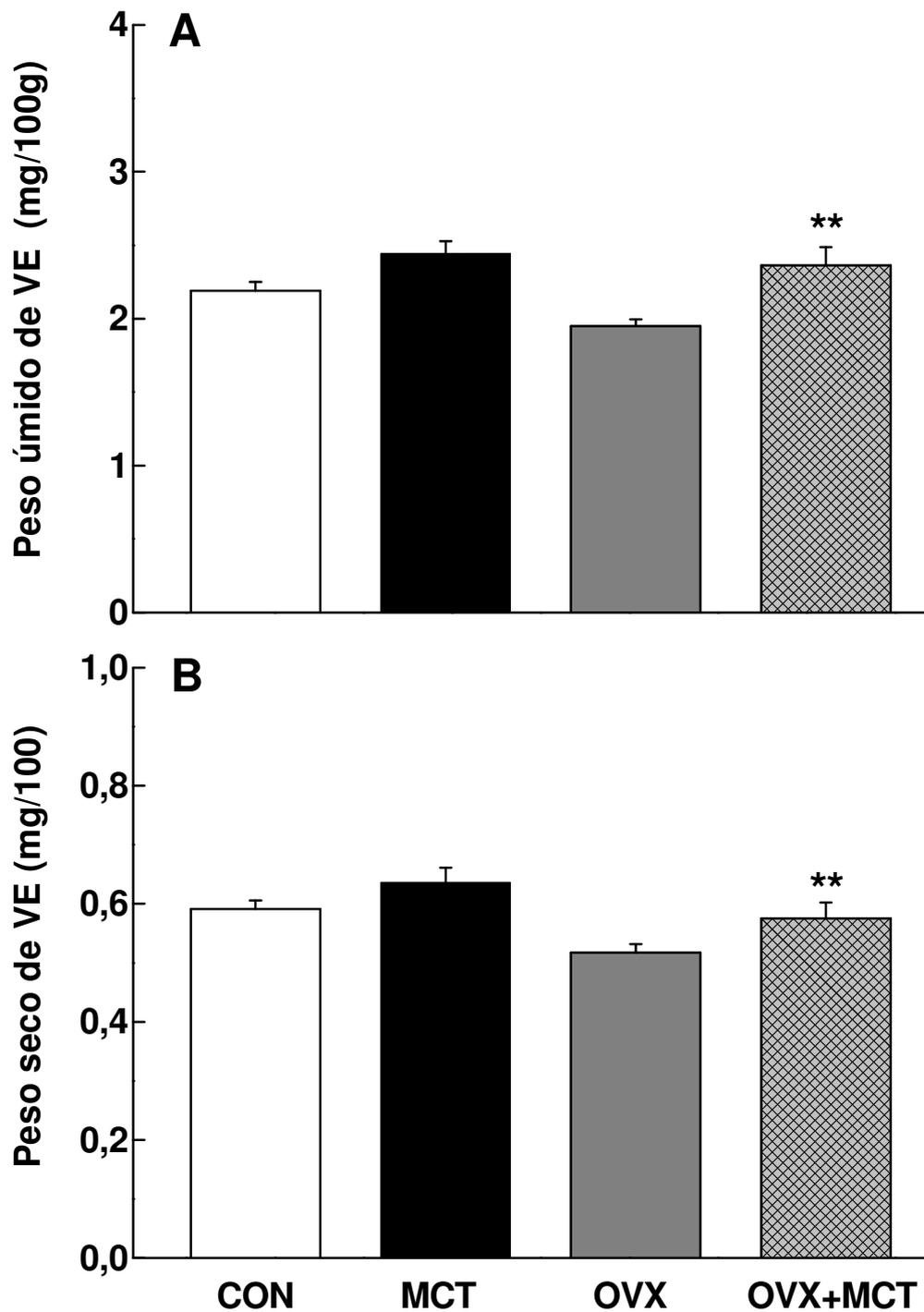


Figura 8 – Valores de peso úmido (A) e seco (B) de ventrículo esquerdo em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizados (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao OVX. & $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

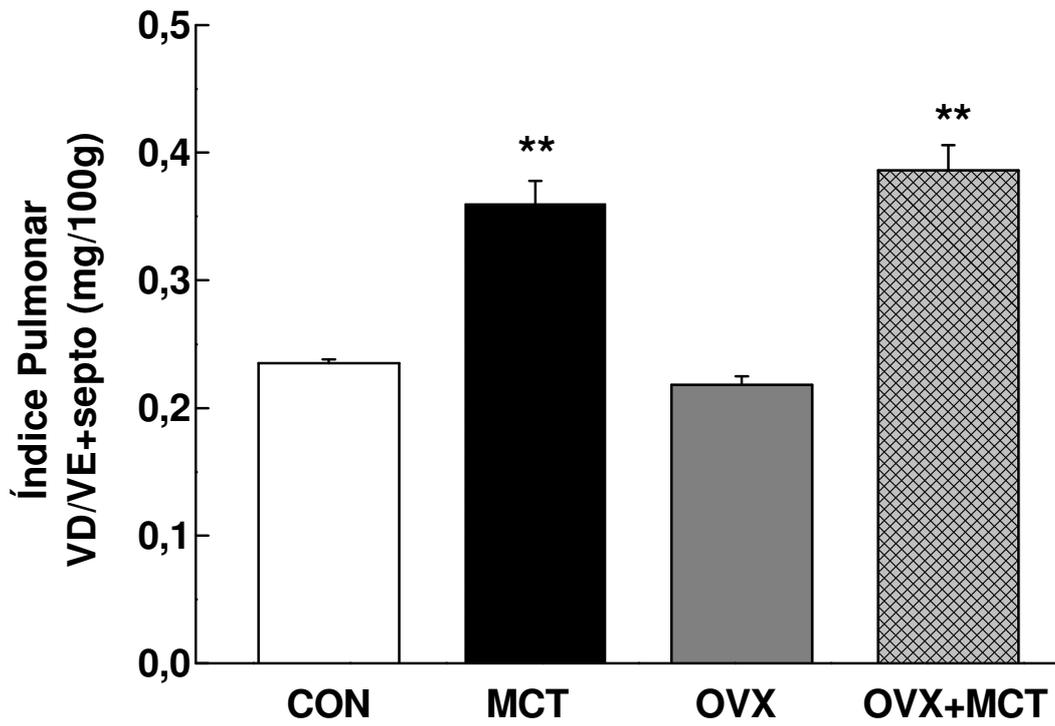


Figura 9 – Valores do Índice Pulmonar em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizados (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON.

5.0 – VALORES BASAIS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)

Na figura 10 apresentamos os valores basais de PAM e FC dos grupos CON (n=10), MCT (n=10), OVX (n=8) e OVX+MCT (n=5). Podemos observar inicialmente que houve uma redução significativa da PAM no grupo OVX em relação ao grupo CON ($98 \pm 3^{##}$ vs 113 ± 3 mmHg, respectivamente. $^{##}p < 0,01$), assim como do grupo OVX+MCT quando comparado ao grupo MCT ($85 \pm 5^{&&}$ vs 114 ± 3 mmHg, respectivamente. $^{&&}p < 0,01$ e $^{##}p < 0,01$). Também observamos que houve uma redução da PAM do grupo OVX+MCT quando comparado ao grupo OVX ($85 \pm 5^*$ vs 98 ± 3 mmHg, respectivamente. $^*p < 0,05$). Em relação a FC, podemos observar que o grupo MCT apresentou um aumento quando comparado ao grupo CON ($395 \pm 14^*$ vs 366 ± 8 bpm, respectivamente. $^*p < 0,05$), assim como o grupo OVX+MCT quando comparado ao grupo OVX ($425 \pm 10^*$ vs 389 ± 15 bpm, respectivamente. $^*p < 0,05$).

Observamos também que o grupo OVX apresentou valores significativamente reduzidos, quando comparado ao grupo CON, de pressão arterial sistólica (PAS) ($120 \pm 4^{##}$ vs 139 ± 3 mmHg, respectivamente. $^{##}p < 0,01$) (Figura 11A) e de pressão arterial diastólica (PAD) ($81 \pm 4^{\#}$ vs 94 ± 5 mmHg, respectivamente. $^{\#}p < 0,05$) (Figura 11B). O grupo OVX+MCT também apresentou redução da PAS e PAP tanto em relação ao grupo OVX quanto em relação ao grupo MCT. A saber, PAS ($98 \pm 3^{**&&}$ vs 120 ± 4 vs 140 ± 5 mmHg, respectivamente. $^{**}p < 0,01$ e $^{&&}p < 0,01$) e PAP ($26 \pm 3^{**&&}$ vs 38 ± 2 vs 45 ± 3 mmHg, respectivamente. $^*p < 0,05$ e $^{&&}p < 0,01$). Por outro lado, a PAD apresentou-se reduzida no grupo OVX+MCT somente em relação ao grupo MCT ($72 \pm 6^{&&}$ vs 95 ± 4 mmHg, respectivamente. $^{&&}p < 0,01$).

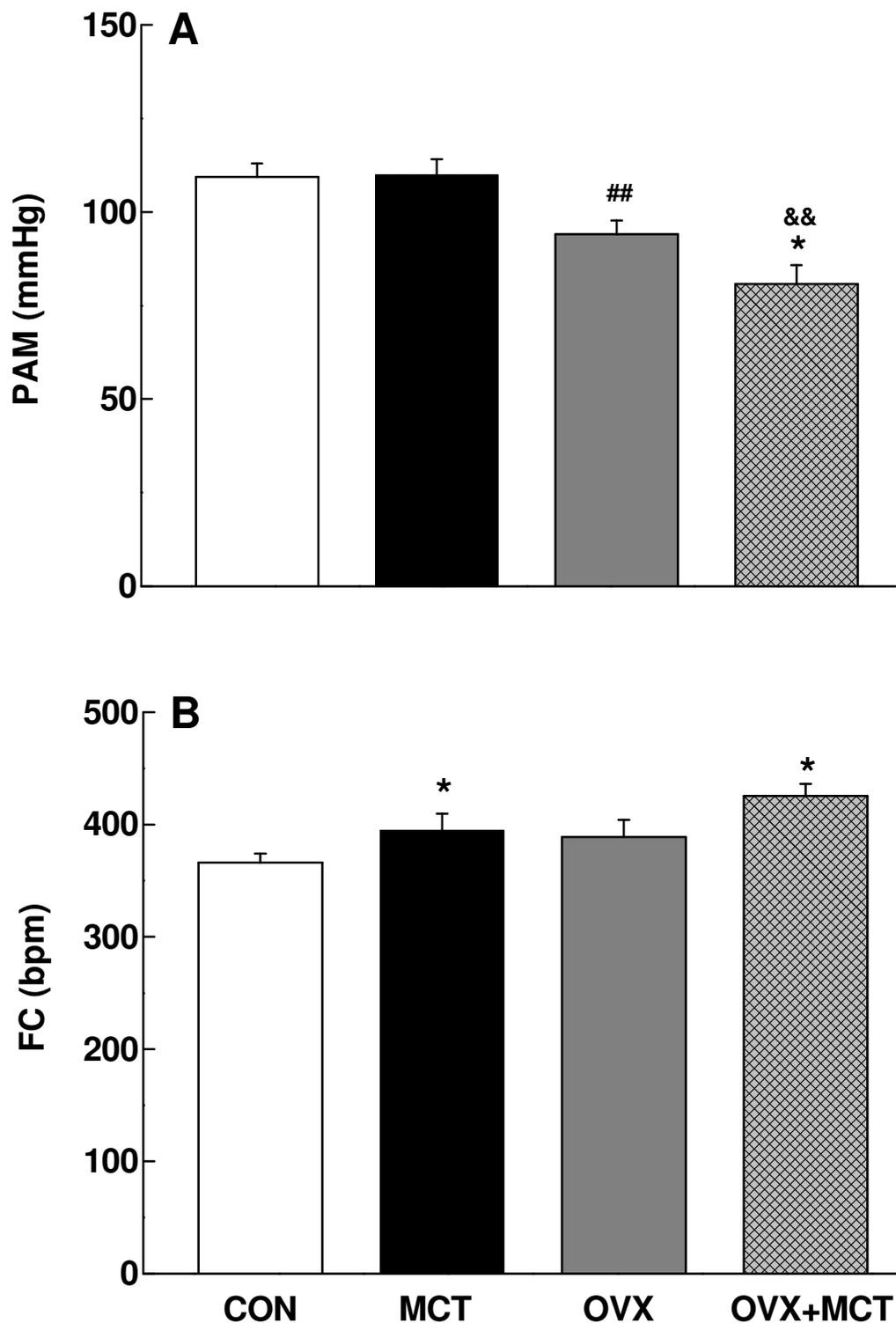


Figura 10 – Valores basais de PAM (A) e de FC média (B) dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação aos respectivos grupos controles. ## $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. && $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

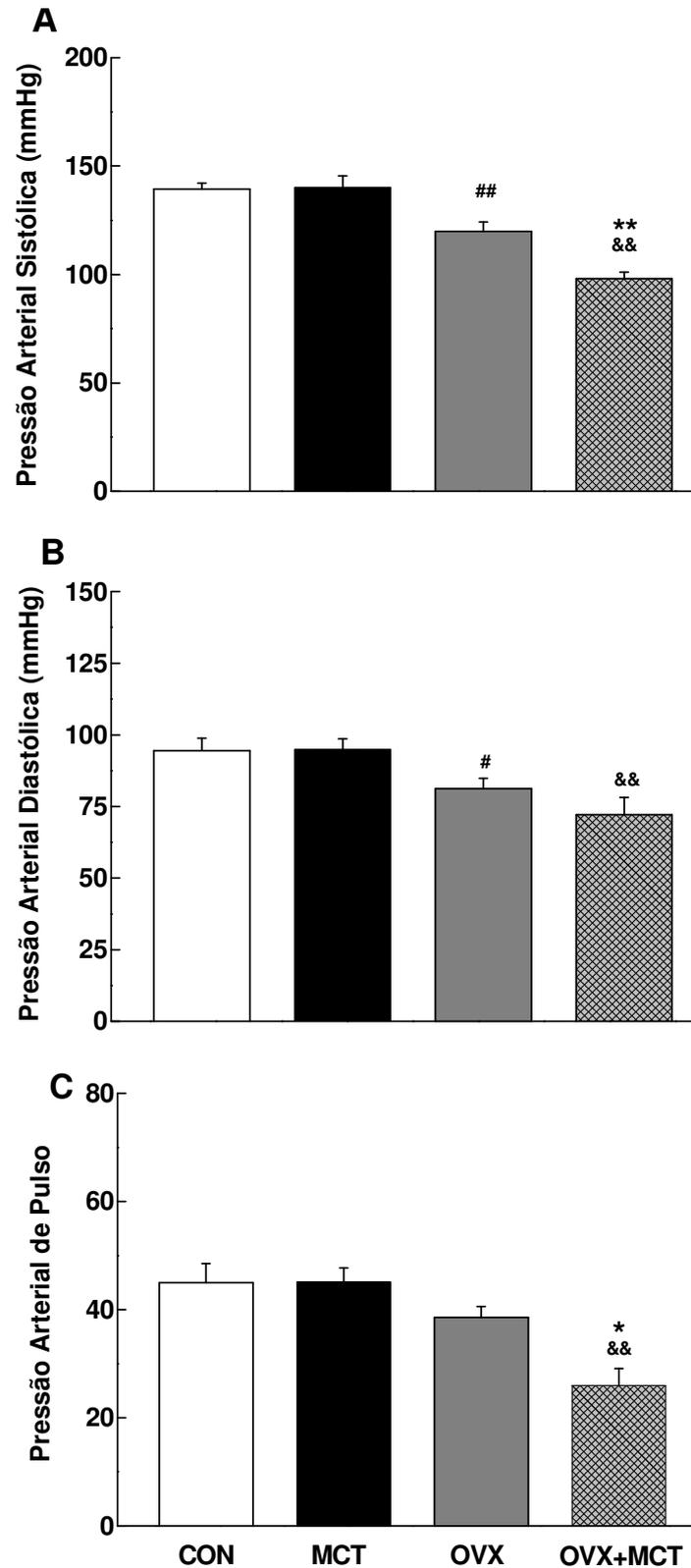


Figura 11 – Valores basais de PAS (A), PAD (B) e de PAP (C) dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação aos respectivos grupos controles. ## $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. && $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

6.0 - AVALIAÇÃO AUTONÔMICA

Na figura 12 apresentamos os valores de FC antes e após os bloqueios com atenolol e metil-atropina dos grupos controle (CON) (n=10), monocrotalina (MCT) (n=10), ooforectomizados (OVX) (n=8) e ooforectomizados monocrotalina (OVX+MCT) (n=5). Estes bloqueios foram utilizados a fim de obtermos uma estimativa da atuação dos componentes simpático e parassimpático sobre o coração.

Podemos observar inicialmente no grupo CON a predominância do componente parassimpático sobre o simpático nos animais deste grupo, a qual foi invertida em todos demais grupos, onde a predominância do componente simpático foi verificada. Com isso, podemos observar que o bloqueio com Atenolol revelou uma atividade simpática significativamente maior no grupo MCT comparado ao CON ($-73 \pm 9^{**}$ vs -35 ± 4 bpm, respectivamente. $^{**}p < 0,01$), no grupo OVX+MCT comparado ao OVX ($-113 \pm 6^{**}$ vs -76 ± 12 bpm, respectivamente. $^{**}p < 0,01$), no grupo OVX comparado ao CON ($-76 \pm 9^{##}$ vs -35 ± 4 bpm, respectivamente. $^{##}p < 0,01$), assim como no grupo OVX+MCT comparado ao grupo MCT ($-113 \pm 6^{&&}$ vs -73 ± 9 bpm, respectivamente. $^{&&}p < 0,01$).

Observamos também que o bloqueio combinado (atenolol + metil-atropina) mostrou uma atividade bastante atenuada do componente parassimpático no grupo OVX+MCT. Uma atenuação significativa do componente parassimpático foi observada também no grupo MCT comparado ao CON ($26 \pm 8^{**}$ vs 53 ± 10 bpm, respectivamente. $^{**}p < 0,01$), no grupo OVX+MCT comparado ao OVX ($1 \pm 1^{**}$ vs 6 ± 1 bpm, respectivamente, $^{**}p < 0,01$), no grupo OVX comparado ao CON ($6 \pm 1^{##}$ vs 53 ± 10 bpm, respectivamente. $^{##}p < 0,01$), assim como do grupo OVX+MCT comparado ao MCT ($1 \pm 1^{&&}$ vs 26 ± 8 bpm, respectivamente. $^{&&}p < 0,01$).

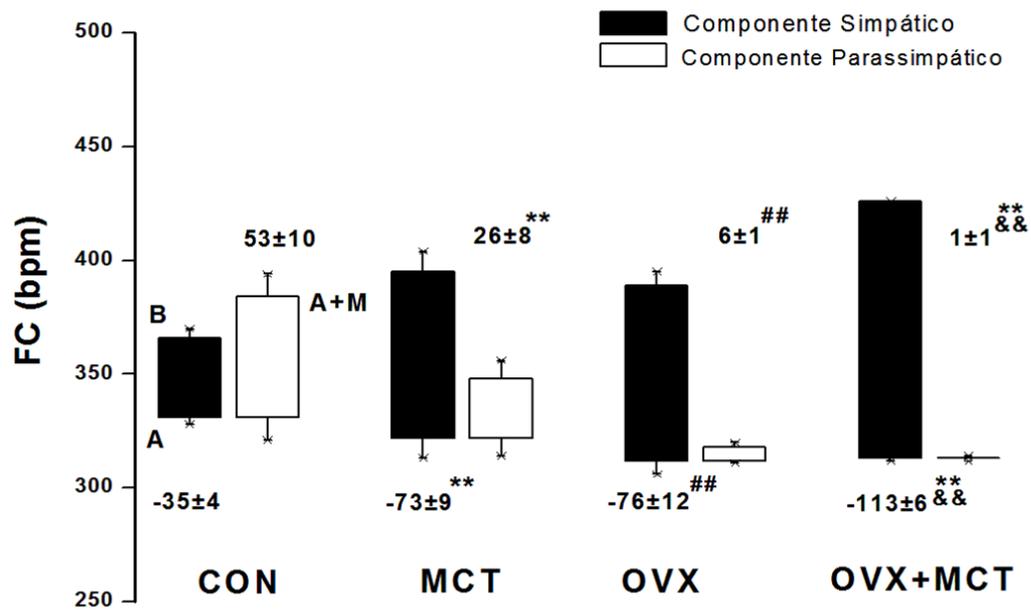


Figura 12 – Valores de frequência cardíaca (FC) basal (B), após bloqueio com Atenolol (A) e após bloqueio com Atenolol + Metil-Atropina (A+ monocrotalina M) em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado (OVX+MCT). ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON. ## $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. && $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

7.0– REGISTROS VENTILATÓRIOS

Na figura 13, apresentamos os valores de volume corrente (V_C), frequência respiratória (FR), volume-minuto (V_{min}) e ventilação alveolar (V_A) dos animais dos grupos CON (n=9), MCT (n=9), OVX (n=9) e OVX+MCT (n=8). Inicialmente podemos observar que o OVX+MCT apresentou valores significativamente menores de V_C em relação aos grupos OVX e MCT ($1,36 \pm 0,06^{&}$ vs $2,16 \pm 0,11$ vs $2,04 \pm 0,08$ mL, respectivamente. $^{\&}p < 0,01$) (Figura 13A). Foram observados também aumentos significativos de FR do grupo OVX+MCT em relação ao grupo OVX ($153 \pm 8^{**}$ vs 99 ± 4 cpm, respectivamente. $^{**}p < 0,01$) (Figura 13B). Em relação ao V_{min} , observamos que o grupo MCT apresentou um aumento significativo em relação ao grupo CON ($258 \pm 15^*$ vs 204 ± 7 mL.min, respectivamente. $^*p < 0,05$), assim como também apresentou um aumento significativo da V_A em relação ao grupo CON ($193^* \pm 9$ vs 150 ± 7 mL.min, respectivamente. $^*p < 0,05$). Entretanto, o grupo OVX+MCT apresentou valores significativamente menores de V_{min} ($p < 0,05$) e V_A ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo MCT. A saber: V_{min} (212 ± 19) e V_A (135 ± 15) (Figura 13C).

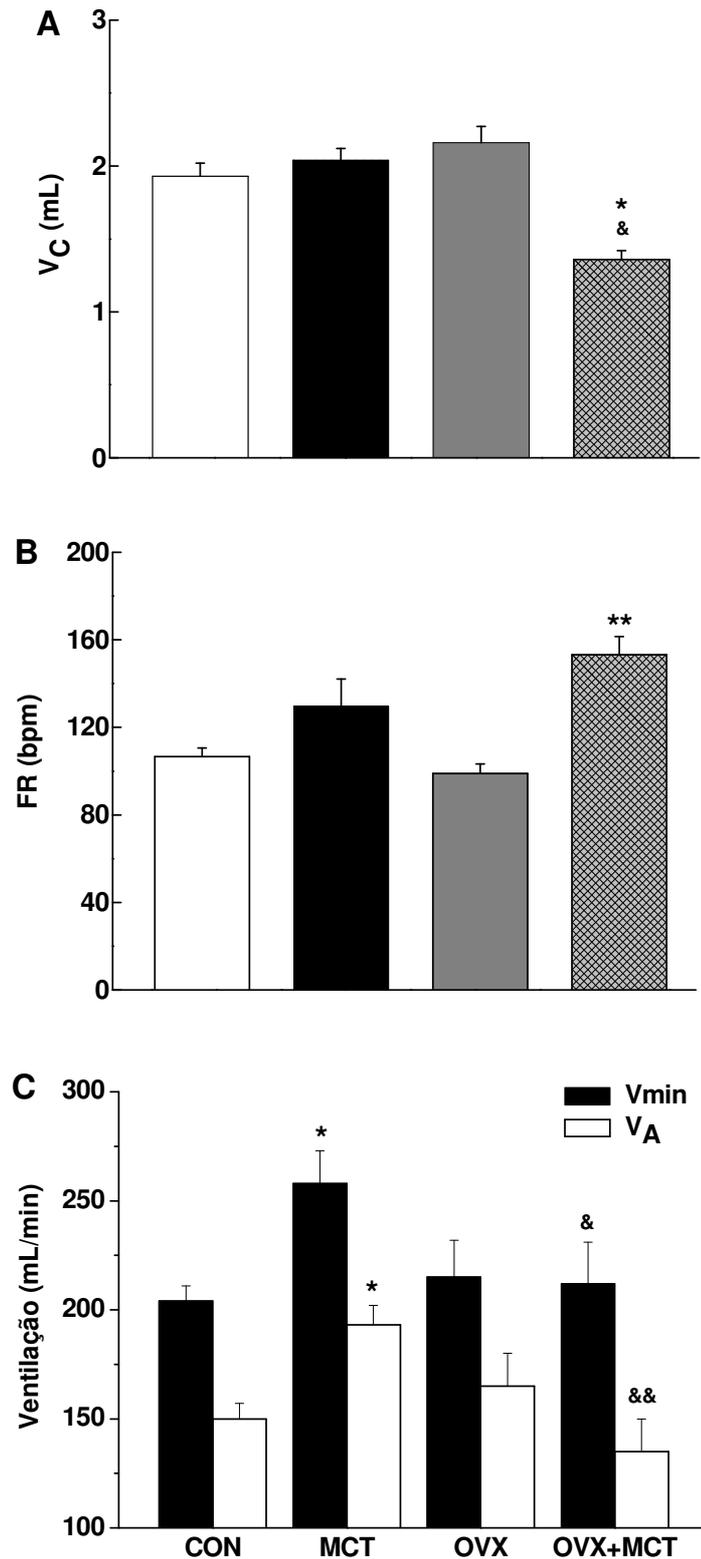


Figura 13 – Valores de Volume Corrente (V_C) (A), Frequência Respiratória (FR) (B) e de Volume-Minuto (V_{min}) (C) em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON. & $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

8.0 - GASOMETRIA

Na figura 14 apresentamos os valores da pressão parcial de O_2 no sangue arterial (PaO_2) e da porcentagem de saturação de hemoglobina (%Sat Hb) dos grupos CON (n=8), MCT (n=9), OVX (n=7) e OVX+MCT (n=7). Inicialmente, podemos observar uma diminuição significativa nos níveis de PaO_2 do grupo MCT comparado ao CON ($84\pm 2^{**}$ vs 95 ± 2 mmHg, respectivamente. $**p<0,01$) e do OVX+MCT comparado ao OVX ($85\pm 3^{**}$ vs 93 ± 2 mmHg, respectivamente. $**p<0,01$) (Figura 14A). Observamos também que a % Sat Hb também foi menor significativamente no grupo MCT comparado ao CON ($93\pm 2^{**}$ vs 97 ± 2 %, respectivamente. $**p<0,01$), no grupo OVX+MCT comparado ao OVX ($89\pm 1^*$ vs 93 ± 1 %, respectivamente. $*p<0,05$), no grupo OVX+MCT comparado ao MCT ($89\pm 1^{\&}$ vs 93 ± 2 %, respectivamente. $^{\&}p<0,05$), assim como do grupo OVX comparado ao grupo CON ($93\pm 0,9^{\#}$ vs $97\pm 0,2$ % respectivamente. $^{\#}p<0,05$) (Figura 14B).

Na figura 15 apresentamos os valores do potencial hidrogeniônico (pH), pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial ($PaCO_2$) e dos íons bicarbonato (HCO_3^-) dos animais dos grupos CON (n=8), MCT (n=9), OVX (n=7) e OVX+MCT (n=7). Podemos observar que não houveram diferenças significativas dos valores de pH e de HCO_3^- nos grupos estudados (Figura 15A e C). Entretanto, observamos um aumento significativo da $PaCO_2$ no grupo MCT se comparado ao CON ($37\pm 0,5^{**}$ vs $33\pm 0,7$ mmHg, respectivamente. $**p<0,01$) (Figura 15B).

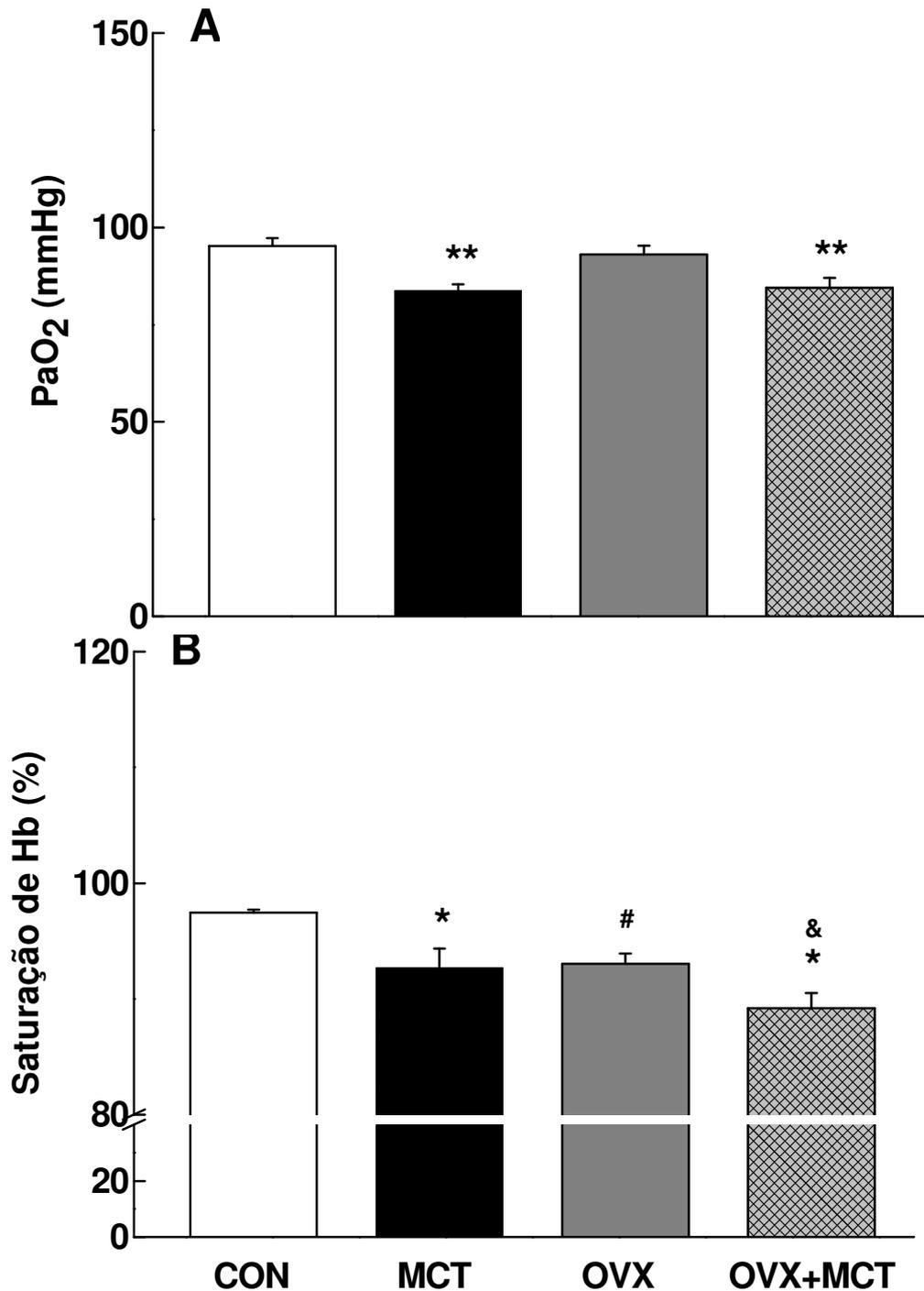


Figura 14 – Valores gasométricos da Pressão parcial de Oxigênio no sangue arterial (PaO₂) (A) e da porcentagem de saturação de hemoglobina (%Sat Hb) (B) em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). *p<0,05 **p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON. #p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. &p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

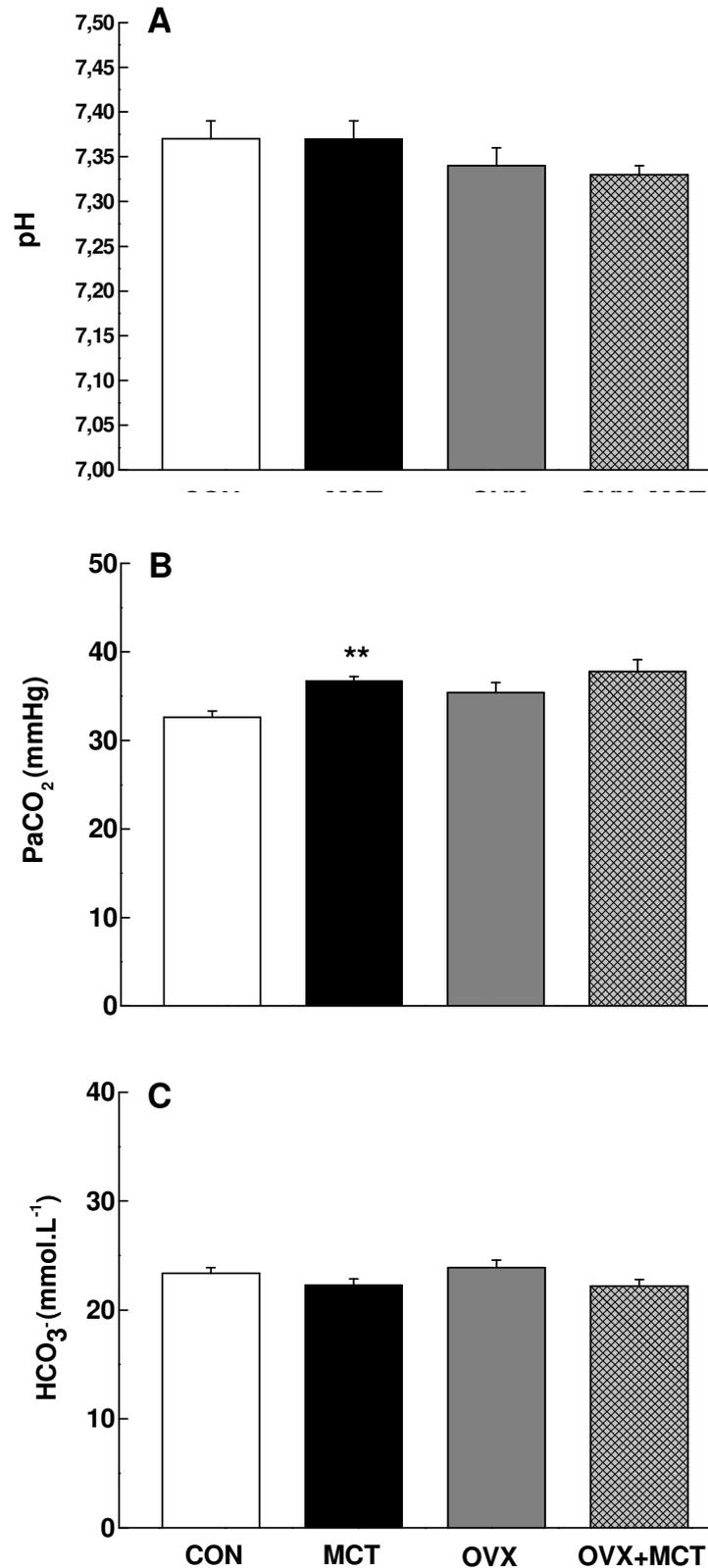


Figura 15 – Valores gasométricos do potencial hidrogeniônico (pH) (A), da pressão arterial de dióxido de carbono (PaCO₂) (B) e do bicarbonato (HCO₃⁻) (C) em relação aos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). **p<0,01 indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON.

9.0 – REFLEXOS CARDIOVASCULARES

9.1 – Avaliação do barorreflexo

Na figura 16 apresentamos as barocurvas e a primeira derivada logística sigmoidal dos grupos CON (n=8), MCT (n=9), OVX (n=9) e OVX+MCT (n=4). Podemos observar que nos grupos MCTs, a barocurva sigmoidal apresenta uma alteração significativa na sua inclinação (slope) se comparada aos respectivos grupos controles (Figura 16A). Esta alteração pode ser melhor visualizada na Figura 16B, 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 MCT em relação ao grupo CON ($-3,63 \pm 0,5$ vs $-6,37 \pm 0,7$ bpm.mmHg⁻¹, respectivamente. *p<0,05) e do grupo OVX+MCT tanto em relação ao grupo OVX ($-1,54 \pm 0,7$ vs $-4,36$ bpm.mmHg⁻¹, respectivamente. *p<0,05) assim como do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT ($-1,54 \pm 0,7$ vs $-3,63$ bpm.mmHg⁻¹, respectivamente. &p<0,05).

Na tabela III apresentamos a média dos dados dos parâmetros das barocurvas, bem como dos ganhos médios do barorreflexo dos grupos CON (n=8), MCT (n=9), OVX (n=7) e OVX+MCT (n=4).

Considerando-se as significativas alterações observadas no ganho barorreflexo dos grupos estudados, fizemos uma avaliação da magnitude máxima das respostas pressoras induzidas pela Fenilefrina e depressoras induzidas pelo Nitroprussiato de Sódio, tendo em vista que as respostas de FC são reflexas a estes estímulos. Estes resultados estão apresentados nas figuras 17 e 18. Observamos que a magnitude das respostas pressoras à Fenilefrina foi semelhante entre os grupos e suficiente para estimular efetivamente os barorreceptores, apesar do grupo OVX+MCT apresentar um valor significativamente menor que o grupo OVX ($40 \pm 1^*$ vs 50 ± 3 mmHg, respectivamente. *p<0,05). Os grupos MCT e CON apresentaram os seguintes valores: 49 ± 2 vs 48 ± 4 mmHg (Figura 17A). Na figura 17B apresentamos as bradicardias reflexas e conforme pode ser observado o grupo MCT apresentou valores

significativamente menores que o CON ($-119 \pm 25^{**}$ vs -186 ± 18 bpm, $^{**}p < 0,01$), e o grupo OVX+MCT apresentou valores menores tanto em relação ao OVX, como em relação ao grupo MCT (OVX+MCT = $-29 \pm 11^{**\&}$; OVX = -146 ± 12 ; MCT = -119 ± 25 bpm). O grupo OVX também apresentou valores menores que o grupo CON ($p < 0,05$).

Na figura 18 observamos que a magnitude das respostas depressoras ao Nitroprussiato de Sódio foram similares, embora o grupo OVX tenha apresentado diferença significativa em relação ao grupo CON ($-46 \pm 3^{\#}$ vs -53 ± 3 mmHg. $^{\#}p < 0,05$ respectivamente) (Figura 18A). Em relação às taquicardias reflexas (Figura 18B), observamos uma atenuação significativa apenas no grupo OVX+MCT em relação aos grupos OVX e MCT (OVX+MCT = $10 \pm 3^{**\&}$; OVX = 69 ± 7 ; MCT = 50 ± 13 bpm. $^{**}p < 0,01$ e $^{\&}p < 0,05$). O grupo CON apresentou os seguintes valores: 71 ± 10 bpm.

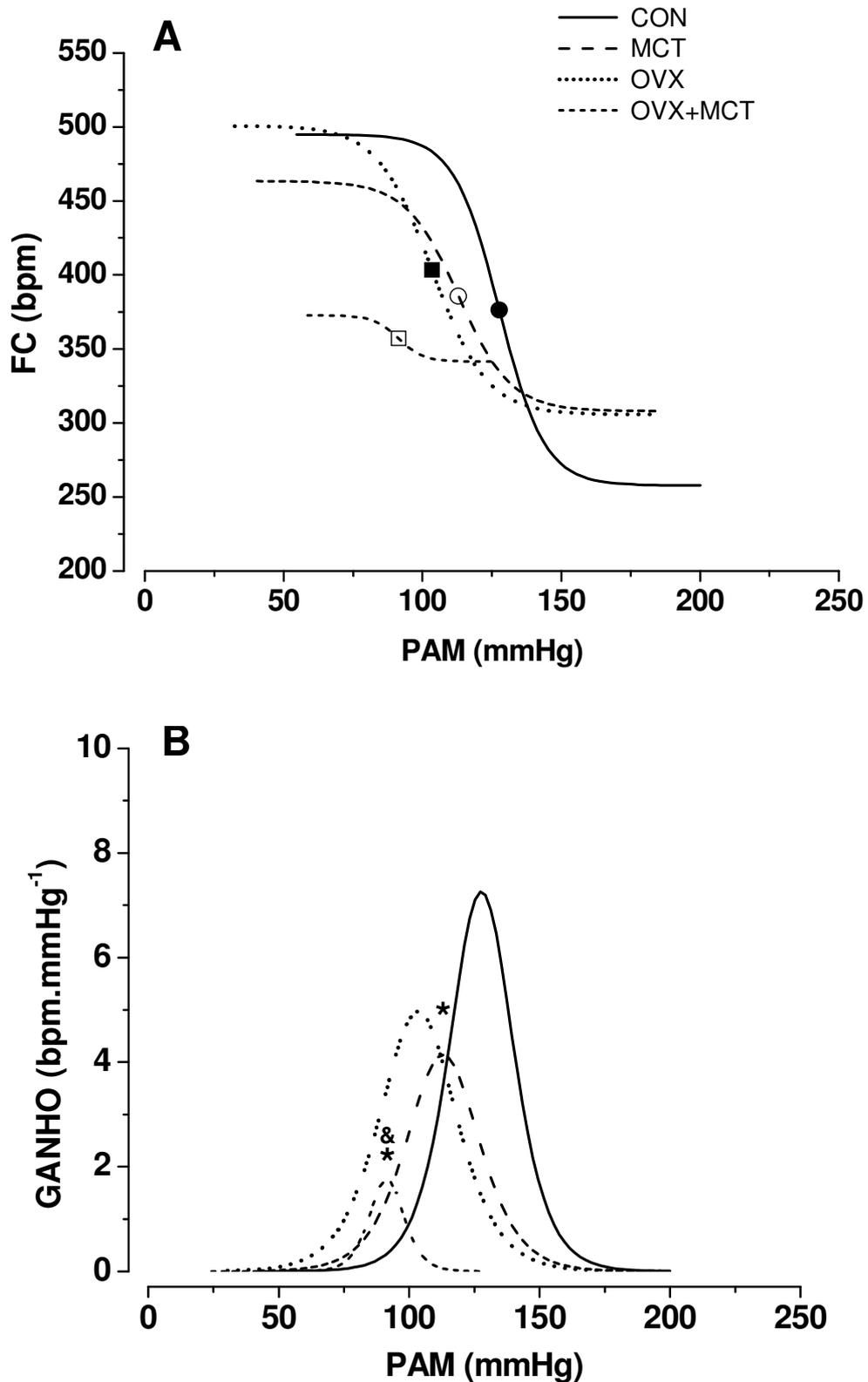


Figura 16 – Barocurvas sigmoidais (A) e a primeira derivada logística sigmoidal (ganho máximo) (B) dos grupos (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON. & $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

Tabela III – Valores de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), platôs de bradicardia e taquicardia, amplitude, PA₅₀ e ganho médio dos animais dos grupos CON, MCT, OVX e OVX+MCT.

Parâmetros	Grupos			
	CON	MCT	OVX	OVX+MCT
PAM (mmHg)	107±5	96±7	99±4	79±5 ^{**&}
FC (bpm)	426±15	413±13	430±6	372±17 [*]
Platô de bradicardia (bpm)	257±18	308±14	305±11	341±25
Platô de taquicardia (bpm)	495±17	463±13	501±4	373±18 ^{**&&}
Amplitude (bpm)	237±27	155±17	195±9	31±8 ^{**&&}
PA ₅₀ (mmHg)	127±6	113±6	103±5 [#]	91±11
Ganho médio (bpm.mmHg ⁻¹)	-6,37±0,7	-3,62±0,5 [*]	-4,35±0,7	-1,53±1,75 ^{*&}

PA₅₀, pressão arterial média no ponto médio da curva. *p<0,05 **p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação aos respectivos controles. #p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CON. &<0,05 e &&<0,01 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo MCT.

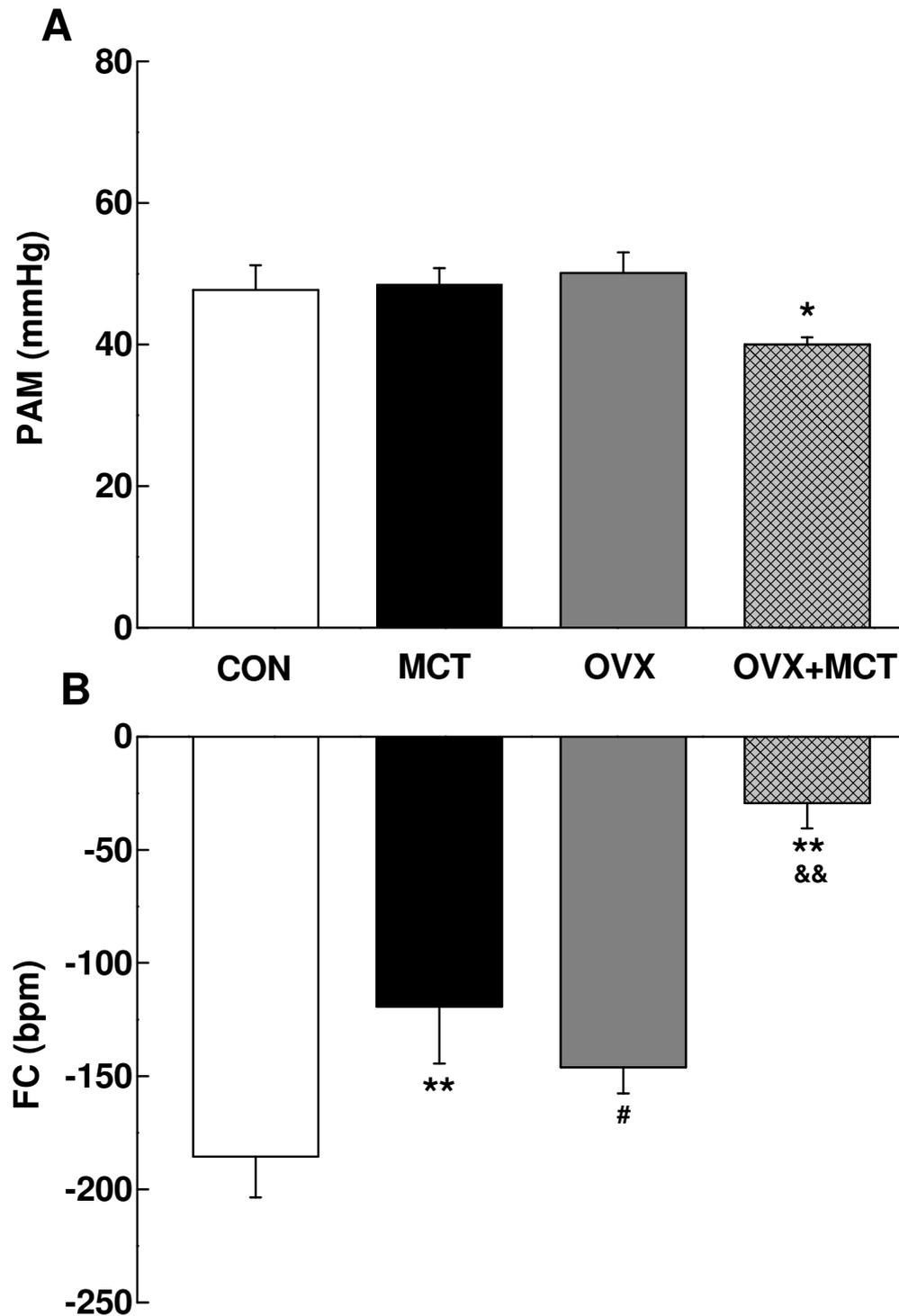


Figura 17 – Variações da pressão arterial média induzida pela fenilefrina (A) e bradicardias reflexas (B) dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizados (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação aos respectivos grupos controle. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON. && $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

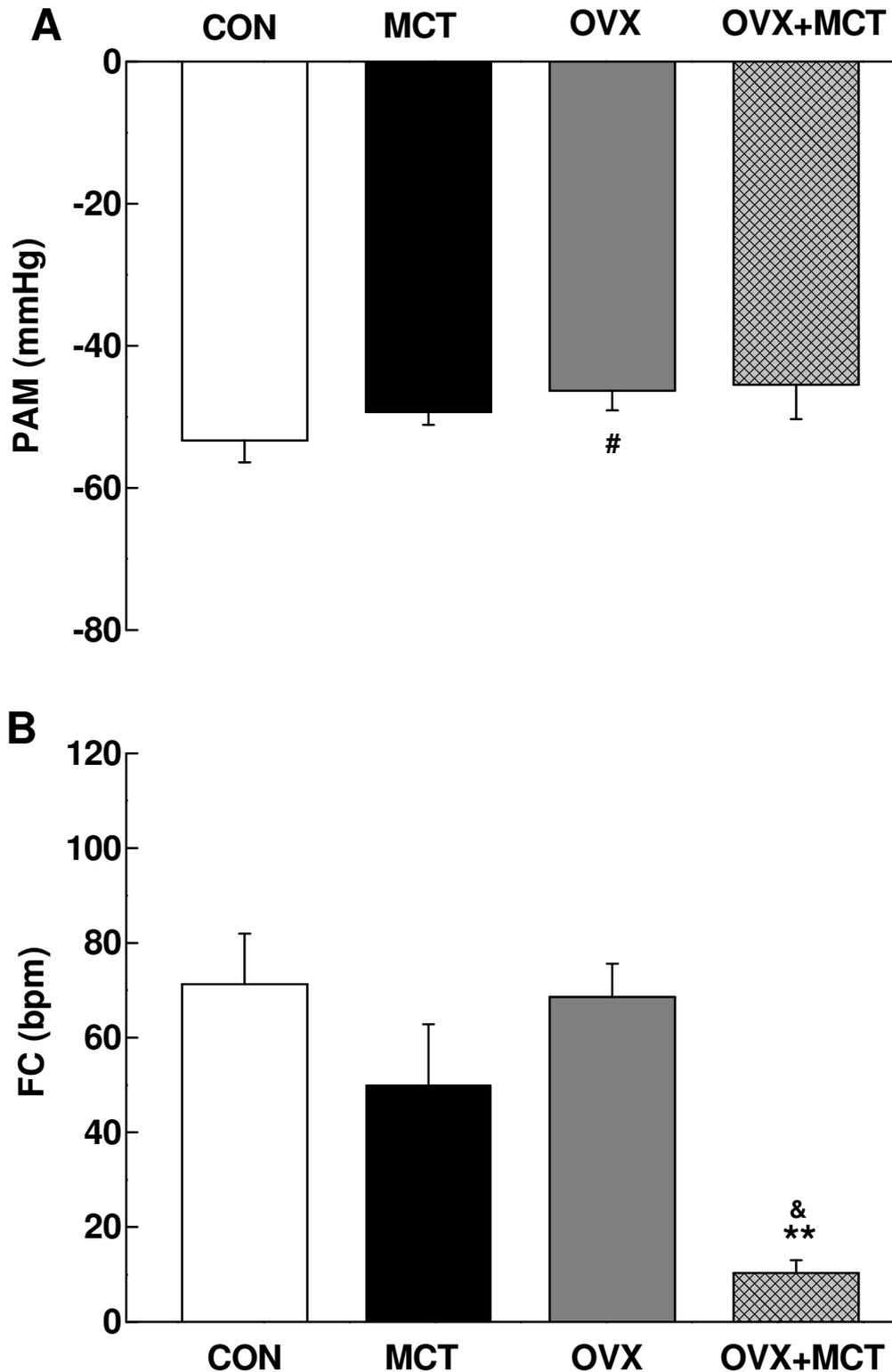


Figura 18 – Variações da pressão arterial média induzida pelo nitroprussiato (A) e taquicardias reflexas (B) dos grupos controle (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizados (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação aos respectivos grupos controle. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX em relação ao grupo CON & $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do grupo OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

9.2 – Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch

Na figura 19 apresentamos os valores das alterações de PAM e FC em resposta à injeção de fenilbiguanida em animais dos grupos CON (n=8), MCT (n=9), OVX (n=9) e OVX+MCT (n=4). Inicialmente, podemos observar na Figura 19A, foram encontradas reduções significativas na PAM nas doses de 6 µg/Kg dos grupos MCT em relação ao CON (-46±3* vs -59±4 mmHg, respectivamente. *p<0,05) e do grupo OVX em relação ao CON (-44±5# vs -59±4 mmHg, respectivamente. #p<0,05). Na dose de 12 µg/Kg dos grupos MCT em relação ao grupo CON (-58±4* vs -69±4 mmHg, respectivamente. *p<0,05) e OVX+MCT tanto em relação ao grupo OVX (-37±2** vs -59±4 mmHg, respectivamente. **p<0,01) quanto em relação ao grupo MCT (-37±2&& vs -58±4 mmHg, respectivamente. &&p<0,01). Na dose de 24 µg/Kg também foram observadas atenuação dos grupos MCT em relação ao CON (-62±3* vs -75±3 mmHg, respectivamente. *p<0,05) e do grupo OVX+MCT tanto em relação ao OVX (-39±3** vs 72±5 mmHg, respectivamente. **p<0,01) quanto em relação ao MCT (-39±3&& vs -62±3 mmHg, respectivamente. &&p<0,01). Por outro lado, foi observado uma redução significativa na FC no grupo OVX+MCT tanto em relação ao grupo OVX quanto em relação ao grupo MCT em todas as doses de fenilbiguanida (Figura 19B). A saber, 1,5 µg/Kg (OVX+MCT= -42±13**&&; OVX= -176±24 e MCT=-194±34 bpm, respectivamente. **p<0,01 e &&p<0,01), 3 (OVX+MCT= -48±7**&&; OVX= -210±23 e MCT= -286±28 bpm, respectivamente. **p<0,01 e &&p<0,01) 6 (OVX+MCT= -42±4**&&; OVX= -245±24 e MCT= -295±27 bpm, respectivamente. **p<0,01 e &&p<0,01) 12 (OVX+MCT= -66±7**&&; OVX= -276±16 e MCT= -317±23 bpm, respectivamente. **p<0,01 e &&p<0,01) e 24 (OVX+MCT= -119±5**&&; OVX= -300±21 e MCT= -320±17 bpm, respectivamente. **p<0,01 e &&p<0,01).

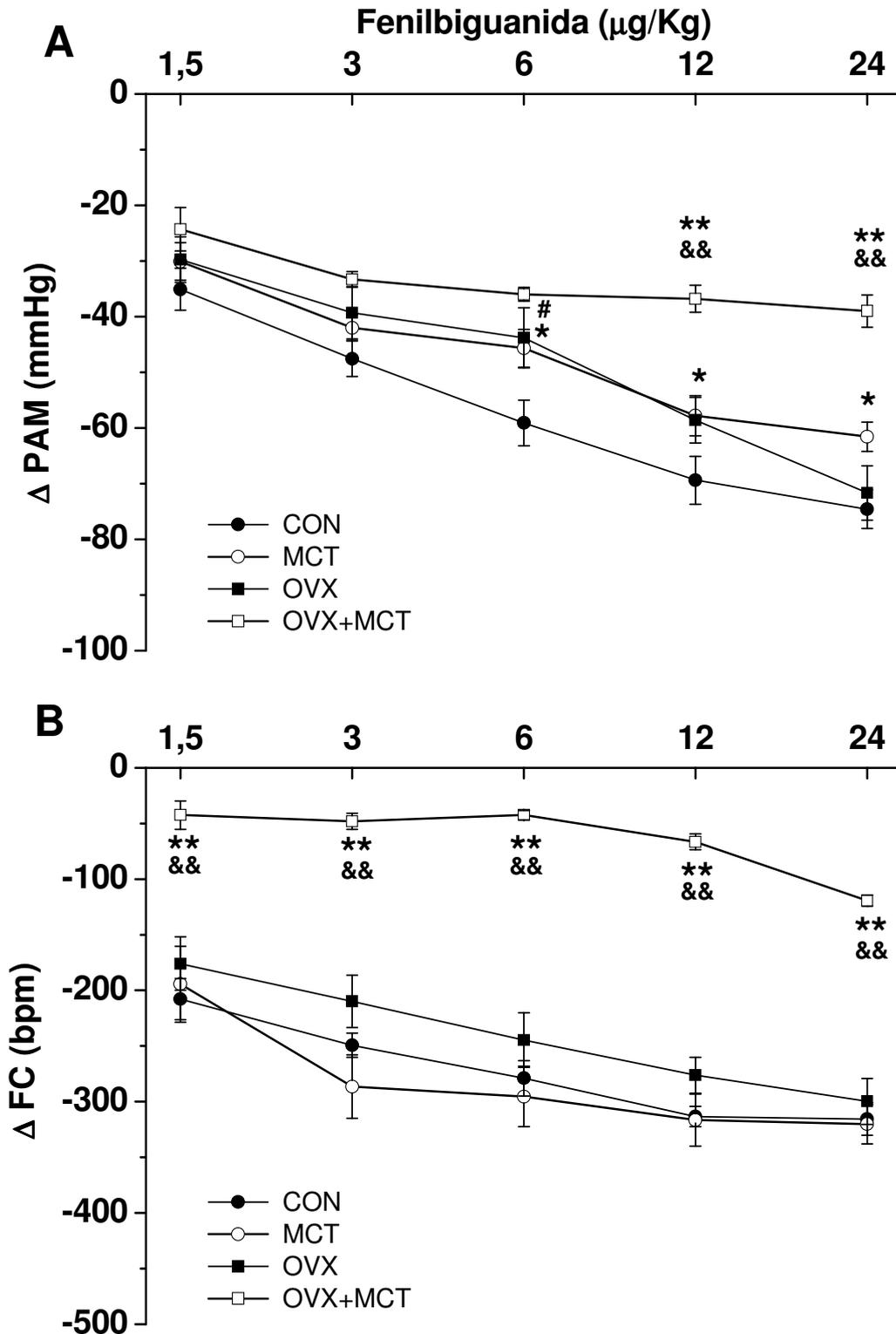


Figura 19 – Variação de pressão arterial média (Δ PAM) (A) e variação de frequência cardíaca (Δ FC) (B) à estimulação de fenilbiguanida nas doses de 1,5; 3; 6; 12 e 24 $\mu\text{g/Kg}$ IV em ratas dos grupos (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON. # $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa do OVX em relação ao grupo CON. && $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa do OVX+MCT em relação ao grupo MCT.

10 – Avaliação Histológica

Observa-se que tanto no grupo CON quanto no grupo OVX o aspecto morfológico apresenta-se semelhante, sendo facilmente observado os bronquíolos com os ramos musculares menores da artéria pulmonar e os sacos alveolares e alvéolos (Figuras 20A, B, C e D). Nos animais tratados com MCT o aspecto morfológico apresenta-se também semelhante independente da ooforectomia. Os pulmões dos grupos MCTs apresentaram hipertrofia evidente da camada muscular dos ramos da artéria pulmonar junto aos bronquíolos (Figuras 20E, F, G e H). A espessura da parede, a relação diâmetro interno/diâmetro externo (DI/DE) e a relação parede/lúmen desses ramos arteriais estão representados na figura 21. Tanto a espessura quanto a relação parede/lúmen estão significativamente aumentados nos grupos OVX+MCT e MCT, sem diferença significativa entre eles. A saber: espessura da parede: MCT vs CON ($0,29 \pm 0,01^{**}$ vs $0,18 \pm 0,01$ μm , respectivamente. $^{**}p < 0,01$) e OVX+MCT vs OVX ($0,29 \pm 0,01^{**}$ vs $0,19 \pm 0,01$ μm , respectivamente. $^{**}p < 0,01$) (Figura 21A); relação parede/lúmen: MCT vs CON ($0,74 \pm 0,05^{**}$ vs $0,29 \pm 0,03$ μm , respectivamente. $^{**}p < 0,01$) e OVX+MCT vs OVX ($0,74 \pm 0,05^{**}$ vs $0,31 \pm 0,01$ μm , respectivamente. $^{**}p < 0,01$) (Figura 21C). Em relação aos valores da relação DI/DE os grupos MCTs apresentaram valores significativamente menores quando comparado a seus grupos controles. A saber: MCT vs CON ($0,41 \pm 1,7^{**}$ vs 64 ± 2 μm , respectivamente. $^{**}p < 0,01$) e OVX+MCT vs OVX ($41 \pm 1,8^{**}$ vs 62 ± 2 μm , respectivamente. $^{**}p < 0,01$) (Figura 21B).

A observação do interior dos lobos pulmonares mostrou um acentuado desenvolvimento de parede muscular nos ramos pulmonares terminais, situados junto aos sacos alveolares e alvéolos nos animais tratados com MCT (Figura 22E, F, G e H). Esses vasos são pouco evidenciáveis, se não estão cheios de sangue, em pulmões dos grupos CON e OVX (Figuras 22A, B, C e D). Para determinar a muscularização dos ramos terminais da artéria pulmonar, que possuem as arteríolas evidentes, foi feita a contagem de vasos nas

áreas próximas aos sacos alveolares. Os resultados visualizados na figura 23 mostram claramente que os números de ramos arteriais evidenciáveis nos grupos MCTs é significativamente maior quando comparado aos seus respectivos grupos controles. A saber: MCT vs CON ($2,9 \pm 0,3$ vs $0,8 \pm 0,3$ número de vasos/ mm^2 , respectivamente) e OVX+MCT vs OVX ($3 \pm 1,1$ vs $0,9 \pm 0,8$ número de vasos/ mm^2 , respectivamente).

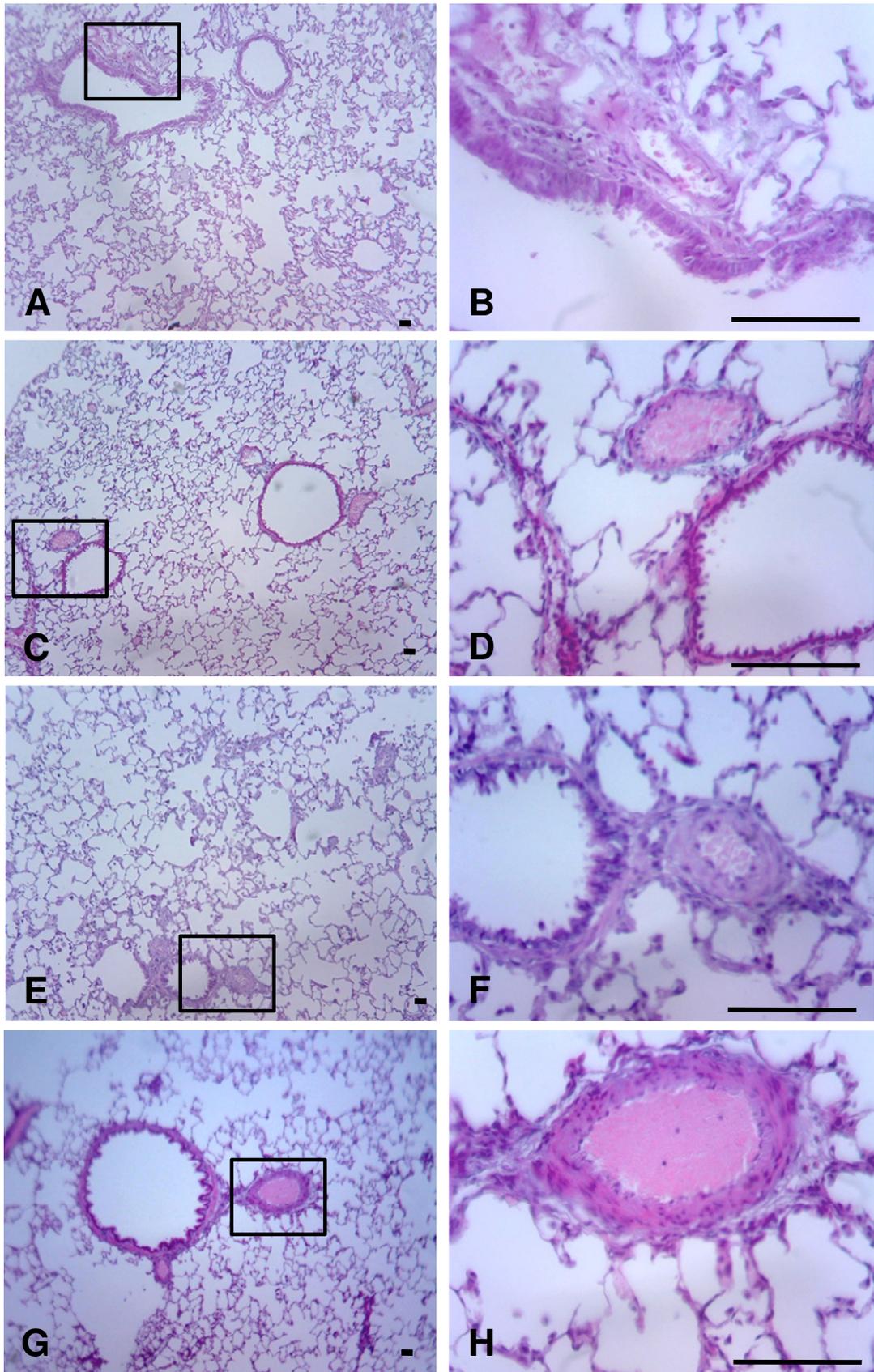


Figura 20 - Fotomicrografia em menor e maior aumento do parênquima pulmonar dos grupos CON (A e B), OVX (C e D), MCT (E e F) e OVX+MCT (G e H) destacando um ramo da artéria pulmonar. Coloração HE.

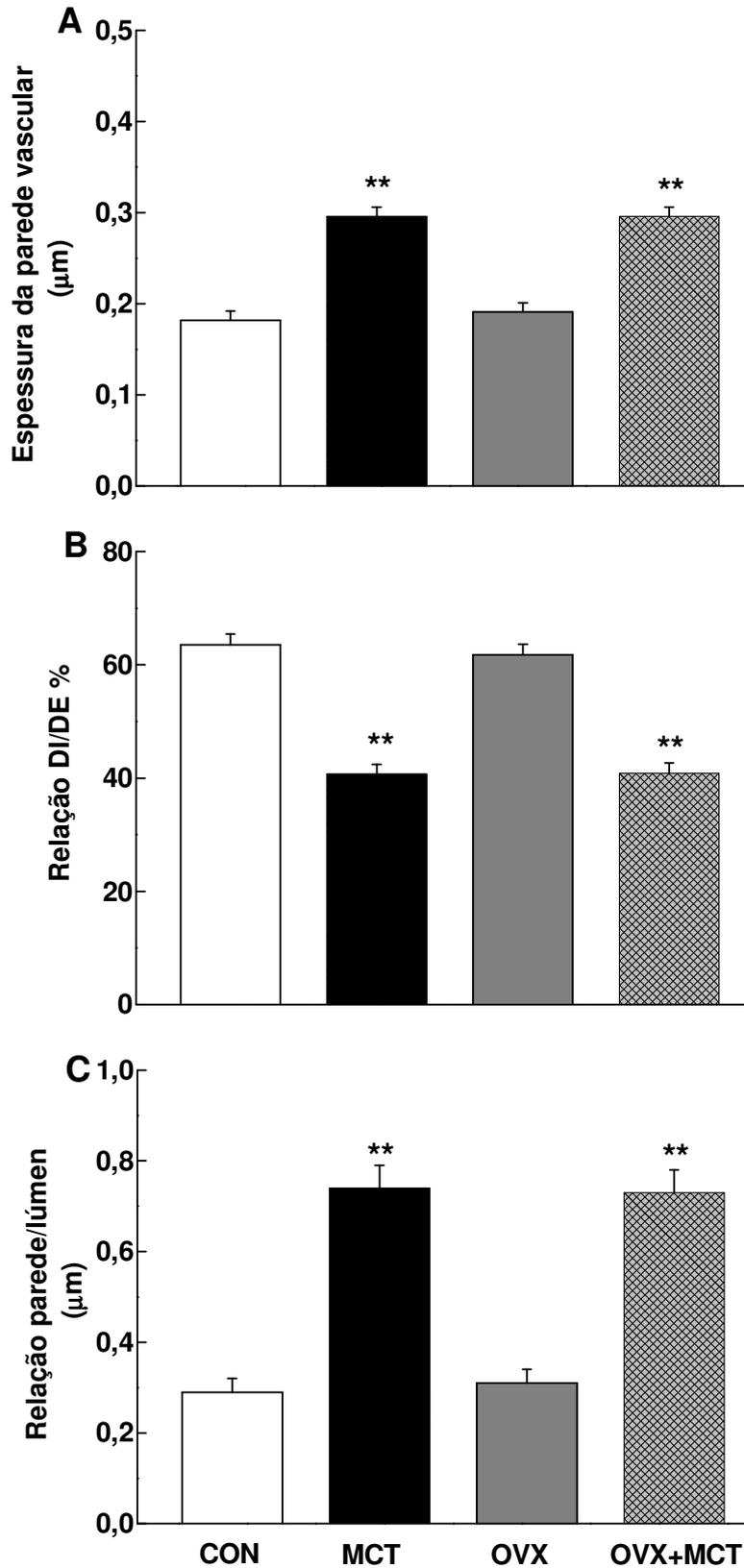


Figura 21 – Valores de espessura da parede vascular (A), da relao dietro interno/dietro externo (%) (B) e da relao dietro interno/espessura de parede (C) dos ramos distais das artrias pulmonares dos grupos CON, MCT, OVX e OVX+MCT. ** $p < 0,01$ indica diferena estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relao ao respectivo grupo CON.

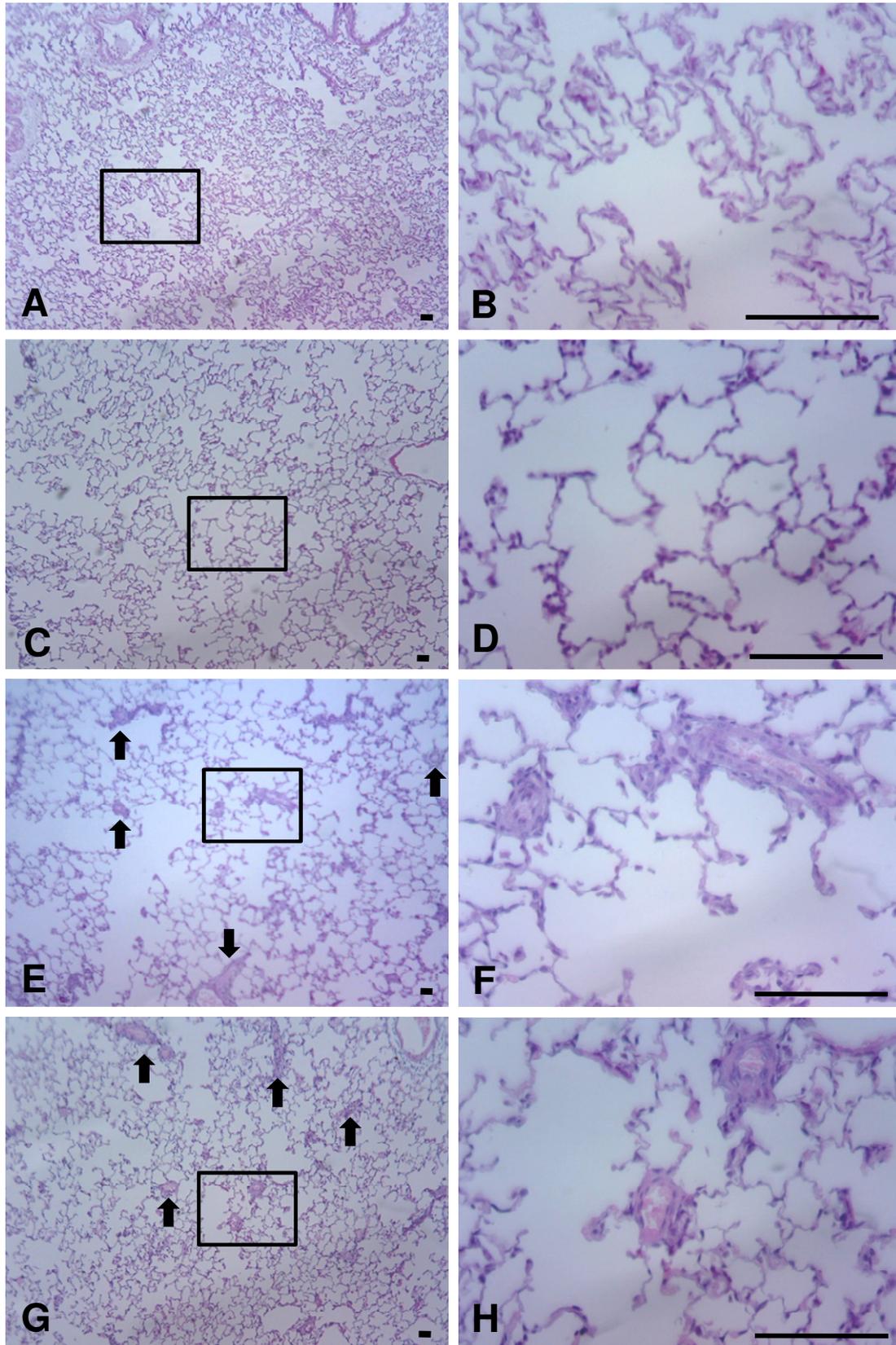


Figura 22- Fotomicrografia em menor e maior aumento do parênquima pulmonar dos grupos CON (A e B), OVX (C e D), MCT (E e F) e OVX+MCT (G e H) destacando um aumento do número de vasos sanguíneos e muscularização dos mesmos. Coloração HE.

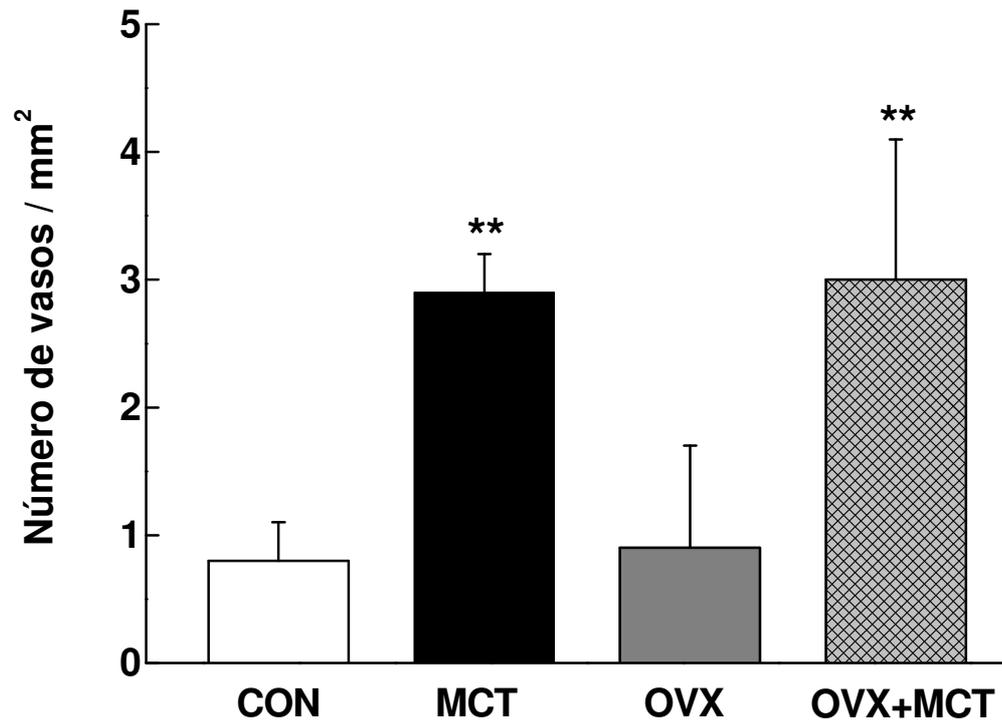


Figura 23 – Número de ramos arteriolares terminais/mm² dos grupos (CON), monocrotalina (MCT), ooforectomizado (OVX) e ooforectomizado monocrotalina (OVX+MCT). ** $p < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa dos grupos MCTs em relação ao respectivo grupo CON.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a HAP induzida pela MCT em ratas promoveu significativas alterações cardiovasculares, respiratórias e autonômicas caracterizadas por hipertrofia do VD, elevação do índice pulmonar, aumento das pressões desenvolvidas pelo VD (PSmax, PDI e PDF), taquicardia, aumento da atividade do componente simpático e atenuação do parassimpático, aumento do Vmin, hipóxia, hipercapnia e atenuação do ganho barorreflexo. A análise morfológica pulmonar por sua vez, mostrou uma elevação significativa da relação espessura de parede/lúmen, além de muscularização dos ramos arteriolares terminais. Por outro lado, o grupo de ratas ooforectomizadas e tratadas com MCT não apresentou um agravamento destes parâmetros morfológicos pulmonares se comparados ao grupo MCT, mas uma piora no quadro da HAP foi observado devido ao aumento adicional da PSmax do VD, PDI e PDF, assim como da atividade do componente simpático e redução adicional do componente parassimpático, além de hipotensão arterial, redução do Vc e da VA, taquipnéia, maior redução do ganho barorreflexo e atenuação do RBJ, além das demais alterações observadas no grupo MCT.

1.0 - Avaliação do peso corporal e eficácia da ooforectomia

A avaliação semanal do peso corporal mostrou um significativo ganho de peso nos grupos OVXs em relação aos demais grupos. Estes resultados estão em acordo com outros estudos da literatura (Tofovic et al., 2006; Wegorzewska et al., 2008). Foi proposto por Naaz et al. (2002) que o tecido adiposo é altamente responsivo aos receptores estrogênicos (RE- α e RE- β), havendo um papel mais

importante para os ER- α neste tecido. Heine et al. (2000) sugeriram anteriormente que o estrogênio regula a quantidade de tecido adiposo branco de forma inibitória através dos RE- α , sendo que a ausência deste receptor causaria hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, resistência à insulina e intolerância à glicose em ambos os sexos. Estes dados corroboram os achados do presente estudo em relação à ooforectomia, onde a deficiência dos hormônios sexuais femininos resultaria no aumento de peso corporal, provavelmente devido à hipertrofia e/ou hiperplasia dos adipócitos. No entanto, este parâmetro não foi avaliado no presente estudo.

Por outro lado, o grupo OVX+MCT apresentou um menor ganho de peso corporal se comparado ao grupo OVX, e ainda uma redução do peso corporal a partir da 3ª de aplicação da MCT. Uma hipótese para explicar este achado seria o fato desses animais apresentarem um elevado esforço respiratório (trabalho) devido à patologia de base, como pode ser observado pela avaliação respiratória, onde observamos hipóxia, hipercapnia, diminuição do V_c , V_A e taquipnéia. Este fato poderia estar contribuindo para um gasto energético elevado, e conseqüentemente, um menor ganho de peso corporal, mesmo estando ooforectomizado. Neste contexto, o grupo MCT, apesar de apresentar a HAP, não mostrou alterações respiratórias na mesma magnitude. Isto poderia explicar o fato do seu peso corporal não apresentar diferença em relação ao seu respectivo grupo controle. Com isto, poderíamos sugerir que a ausência dos hormônios sexuais femininos agrava o quadro respiratório da HAP.

No que tange o tempo de instalação da HAP pela MCT entre os sexos, estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que em ratos machos, são necessárias 3 semanas, enquanto que em fêmeas intactas (não ooforectomizadas)

são necessárias 4 semanas². Este fato também foi observado por outros autores (Tofovic et al., 2005) e provavelmente está relacionado ao efeito protetor conferido pelos hormônios sexuais femininos.

A eficácia da ooforectomia em nossos estudos pode ser verificada pelo peso dos úteros. Observamos que os grupos OVXs apresentaram valores significativamente menores em comparação aos grupos não ooforectomizados. A utilização do peso uterino para mostrar a eficácia deste procedimento cirúrgico tem sido aceita na literatura, a qual foi adotada por vários autores (Medlock et al., 1994; Nutall et al., 1998). Como esperado, a redução do peso decorre da deficiência dos hormônios sexuais femininos. Esta observação foi relatada por Medlock et al. (1994) que demonstrou que o tratamento de reposição hormonal por 3 dias de estrogênio e progesterona, em ratas ooforectomizadas há 7 dias, promoveu um ganho do peso uterino de aproximadamente 25%.

Desta forma, no presente estudo a redução do peso uterino observado nos animais dos grupos OVXs reflete, como esperado, uma deficiência dos hormônios sexuais femininos. Este parâmetro foi utilizado neste estudo como um índice de efetividade da ooforectomia. No grupo OVX+MCT, este procedimento cirúrgico (ooforectomia) realizado previamente à injeção subcutânea de MCT.

2.0 - Índice pulmonar e avaliação histológica

A instalação da HAP foi avaliada no presente estudo através do Índice de Fulton ou Índice Pulmonar. Este índice tem sido rotineiramente utilizado na literatura

² No apêndice 2 mostramos o índice pulmonar de ratas tratadas com MCT por 3 semanas. Observamos que neste período a HAP ainda não está instalada.

para se verificar a existência de hipertrofia ventricular direita nos animais submetidos a HAP, cuja hipertrofia constitui-se num dos principais sinais desta doença. Para tanto, a determinação deste índice é baseada na relação entre os pesos dos ventrículos e do septo interventricular, isto é, $VD/VE+septo$.

No presente estudo, observamos que o Índice Pulmonar foi significativamente aumentado nos grupos tratados com MCT, ou seja, o grupo MCT e grupo OVX+MCT, não havendo diferença estatística entre estes grupos. Isto poderia sugerir que a ooforectomia por si não promoveu um incremento na hipertrofia do VD induzida pela MCT. Além disso, sugere que o tratamento com MCT foi eficaz em promover a hipertrofia do VD e, conseqüentemente, a instalação da HAP.

Contudo, a instalação da HAP também pode ser verificada pela medida da PSmax do VD, a qual foi significativamente aumentada nos grupos MCTs; assim como as pressões diastólicas iniciais e finais. As possíveis causas da gênese destes aumentos serão discutidas detalhadamente a seguir. De qualquer forma, estes achados também foram relatados por outros estudos da literatura (Nishida et al., 2004; Yuyama et al. 2004; Tofovic et al., 2006, Raoul et al. 2007; Nishida et al., 2009).

Além das evidências funcionais da instalação da HAP, nosso estudo também avaliou alguns parâmetros morfométricos dos pulmões dos diversos grupos de animais. Estas análises mostraram que nos grupos tratados com MCT ocorreu uma significativa hipertrofia da camada média dos ramos distais da artéria pulmonar, acompanhadas de uma redução também significativa do lúmen destas artérias. Esta redução foi da ordem de 36% para o grupo MCT e 34% para o grupo OVX+MCT em relação aos seus respectivos controles. Se considerado a relação espessura da

parede/lúmen, observamos que houve um aumento desproporcional entre estas variáveis, isto é, houve muito mais hipertrofia da camada média do que redução do lúmen. Estes dados mostram também que a deficiência dos hormônios sexuais femininos não influenciou nas alterações morfométricas entre os grupos MCTs.

As análises histológicas mostraram ainda que os grupos MCTs apresentaram um importante aumento do número de vasos muscularizados nas regiões lobulares dos ramos distais da artéria pulmonar. Este possível rearranjo vascular poderia ser uma consequência do efeito da MCT nestes vasos pulmonares, o qual já foi descrito anteriormente por King et al. (1994).

3.0 - Avaliação Respiratória e Gasométricas

No presente estudo, utilizando a técnica de pletismografia de corpo inteiro, fizemos a avaliação de V_c , FR, V_{min} e V_A . Esta técnica, descrita por Malan (1973), permite a avaliação respiratória do animal de forma não-invasiva e sem o efeito de anestésico. Nossos resultados mostraram que o V_c foi alterado apenas no grupo OVX+MCT, onde se apresenta significativamente reduzido. Por outro lado, em relação à FR, esta apresentou-se alterada (taquipnéia) apenas neste mesmo grupo. O V_{min} por sua vez foi significativamente aumentada nos grupos MCTs em relação aos seus respectivos grupos controles. Obviamente que as diferenças estatísticas observadas neste último parâmetro, principalmente no grupo MCT, são consequências das tendências de alterações das demais variáveis, ou seja, V_c e FR. Entretanto, no caso do grupo OVX+MCT, é notável que a ooforectomia parece ser o fator que agravou o quadro respiratório destes animais, pois ao contrário do

grupo MCT, o qual apresentou um aumento da V_A , este por sua vez apresentou uma significativa redução.

A gasometria realizada no presente estudo mostrou, por sua vez, a existência de hipoxemia nos grupos MCTs, com uma redução da porcentagem de saturação da Hb mais acentuada no grupo OVX+MCT. Além disso, uma hipercapnia foi observada apenas no grupo MCT. Apesar de haver uma tendência para esta resposta no grupo OVX+MCT, esta não apresentou significância estatística em relação ao seu respectivo grupo controle (grupo OVX), mas sim em relação ao grupo CON ($p < 0,05$).

Contudo, o conjunto dos resultados da avaliação respiratória e gasométrica sugere que os grupos MCTs deflagram mecanismos compensatórios, os quais podem ser observados pelos valores do V_{min} e V_A . Porém, uma certa depressão respiratória (hipoventilação) parece ocorrer no grupo OVX+MCT, uma vez que apenas neste grupo, observamos uma diminuição do V_c e aumento da FR, o que sabidamente aumenta o volume do espaço morto por minuto e conseqüentemente reduz a ventilação alveolar, conforme demonstramos.

Deve ser enfatizado que estas ratas ooforectomizadas, ao perderem a ação dos hormônios sexuais femininos, passam a apresentar o quadro de HAP de forma semelhante aos machos. No entanto, neste estudo elas estariam num estágio mais avançado da HAP, isto é, com uma semana a mais, visto que os machos a desenvolvem em 3 semanas. Isto poderia explicar este quadro respiratório mais agravado se comparado aos demais grupos deste estudo, assim como suas repercussões cardiovasculares e autonômicas. Um possível quadro de insuficiência cardíaca direita deve ser considerado, a qual será abordada adiante nesta discussão.

Por outro lado, uma questão adicional a ser considerada refere-se a elevação da FR dos grupos MCTs, apesar da significância estatística ter sido observada apenas no grupo OVX+MCT.

As alterações ventilatórias têm sido pouco estudadas na HAP experimental, particularmente em ratas, e vários mecanismos permanecem por serem elucidados, principalmente sobre suas implicações sobre o sistema cardiovascular. Relatos subjetivos de “taquipnéia” em ratos tratados com MCT foram descritos nos estudos de Nihei et al. (2005), porém sem uma quantificação deste e de outros parâmetros ventilatórios. Outro relato subjetivo de aumento na FR no modelo de HAP 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 correlacionam estes achados com uma diminuição na densidade dos adrenocetores- β_2 nos pulmões desses animais. Sabidamente, a estimulação destes receptores causa broncodilatação e aumenta a concentração de adenosina monofosfato em mastócitos e basófilos, reduzindo a liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Barnes, 1999). Assim, a diminuição dos 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 a técnica da pletismografia de corpo inteiro em ratos também foi utilizado por Gardner et al. (2004), o qual não observou aumentos das variáveis ventilatórias (FR, Vc e Vmin),

contrastando com nossos resultados. Entretanto, estes ratos foram avaliados 10 dias após o tratamento com MCT, enquanto que o tempo de tratamento dos nossos animais foi de 4 semanas, o que poderia ter contribuído para a instalação incompleta do quadro de HP, bem como os achados subseqüentes.

As seguintes hipóteses poderiam explicar os achados da avaliação respiratória, juntamente com as alterações gasométricas (hipoxemia) encontradas no presente estudo: a) estreitamento progressivo das artérias pulmonares pela MCT, 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 conseqüentemente, um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo e um prejuízo da relação ventilação-perfusão, acarretando hipóxia e aumento da FR, numa tentativa do animal reverter este quadro.

Por outro lado, a ativação dos quimiorreceptores periféricos, um dos mais importantes mecanismos reflexos que promove ajustes cardiorrespiratórios, deve ser considerada. A hipoxemia constitui um dos principais estímulos para ativação dos quimiorreceptores periféricos, os quais promovem um aumento da FR (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 HAP 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 HAP 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 recaptção de substâncias vasoativas, é provavelmente o principal fator na constrição dos vasos pulmonares associados com ventilação hipóxica, edema pulmonar e embolismo pulmonar (Houston e Vanhout, 1986). Sob condições normais, o leito vascular pulmonar não está exposto a concentrações plasmáticas excessivas de 5-HT, devido a 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 HAP poderiam potencializar os efeitos da MCT, promover um aumento da resistência das arteríolas pulmonares e diminuição do fluxo sanguíneo, acarretando hipoxemia e, reflexamente, aumentar a FR.

Alguns estudos da literatura 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 HAP (Eddahibi et al., 2001), estudos em modelos animais evidenciam que não somente o 5-HTT, mas também vários tipos de receptores 5-HT (5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} E 5-HT_{2B}), podem contribuir para o processo de remodelamento vascular (Keegan et al., 2001; Launay et al., 2002).

Contudo, apesar das alterações respiratórias encontradas neste estudo, deve ser considerada também uma fraqueza dos músculos inspiratórios e expiratórios, como já demonstrado por alguns estudos realizados em pacientes com HAP (Meyer et al., 2005; Bauer et al., 2007).

4.0 - Avaliação Autonômica

No presente estudo fizemos a avaliação da atividade autonômica cardíaca simpática e parassimpática através dos bloqueios β_1 -adrenérgico com atenolol e muscarínico com metil-atropina.

A avaliação autonômica mostrou que o tratamento com MCT promoveu uma inversão na atividade dos componentes simpático e parassimpático, ou seja, de vagotônicos passaram a simpatotônicos. Este predomínio da atividade simpática também foi observado no grupo submetido a ooforectomia (grupo OVX). Além disso, um aumento adicional na atividade deste componente foi observado no grupo OVX+MCT. Por outro lado, a atividade do componente parassimpático apresentou-se atenuada no grupo OVX e praticamente ausente no grupo OVX+MCT.

Vários fatores poderiam estar envolvidos nesta disautonomia, tais como: a) modulação do sistema respiratório sobre o sistema cardiovascular b) estimulação dos quimiorreceptores periféricos c) atenuação do ganho barorreflexo e d) redução da modulação central do estrogênio em ratas ooforectomizadas.

Inicialmente, uma interação entre os sistemas respiratório e cardiovascular deve ser considerada. O controle do ritmo cardíaco e respiratório é regulado sinergicamente com o intuito de promover uma adequada ventilação-perfusão ao

nível pulmonar, assegurando uma troca gasosa eficiente (Spyer e Gourine, 1990). Anatomicamente, os circuitos neuronais vagais pré-ganglionares cardíacos e os circuitos pré-simpáticos estão localizados nas regiões ventrolaterais do bulbo, próximos aos circuitos neuronais respiratórios. Existe uma integração cardiorrespiratória, que pode ser demonstrada pela flutuação da FC, conhecida como “arritmia sinusal respiratória”, na qual a frequência de disparo dos neurônios cardio-vagais aumenta durante a expiração e reduz durante a inspiração, resultando em bradicardia e taquicardia, respectivamente. Isto pode ser explicado pelo fato dos neurônios vagais pré-ganglionares, localizados no núcleo ambíguo (NA), receberem potentes descargas inibitórias durante a inspiração e descargas excitatórias durante o período pós-inspiratório (Spyer e Gourine, 1990).

A associação entre a atividade inspiratória e a inibição da bradicardia também é observada quando certas áreas cerebrais são estimuladas. Ou seja, certas áreas que promovem inibição da bradicardia, também promovem elevação da atividade respiratória, enquanto que a estimulação de outras áreas promove bradicardia e apnéia. Em gatos anestesiados, a estimulação da área de defesa hipotalâmica, por exemplo, promove elevação do fluxo sanguíneo muscular, aumenta a descarga simpática e aumenta a atividade respiratória com taquipnéia ou inspiração sustentada (Lopes e Palmer, 1976).

Outro fator importante a ser considerado, diz respeito à distensão pulmonar. De acordo com Lopes e Palmer (1976), quando ocorre a distensão pulmonar, a descarga pulmonar aferente impede o desenvolvimento de bradicardia pela estimulação do nervo do seio carotídeo. Segundo Abboud e Thames (1979), na musculatura lisa das vias aéreas existem receptores que quando ativados, enviam sinais ao SNC através de fibras vagais do tipo A, resultando em taquicardia por

inibição da atividade eferente vagal. Os mecanismos envolvidos nesta inibição reflexa dos neurônios cardio-vagais pelo estiramento pulmonar ainda não estão completamente esclarecidos.

Além dos mecanismos descritos acima, as consequências físicas da respiração induzindo alterações na pressão intra-torácica, levam a alterações na pressão transmural nos vasos sanguíneos intra-torácicos e no coração, afetando diretamente o RV, o DC e a resistência pulmonar e aórtica, sugerindo que alterações no sistema respiratório afetam diretamente o sistema cardiovascular (Sampaio, 2001).

Por outro lado, a ativação de alguns mecanismos de regulação cardiovascular, tais como os quimiorreceptores periféricos, causa uma bradicardia primária que pode ser minimizada por um efeito secundário da estimulação da respiração (Daly e Scott, 1958 *Apud* Haymet e McCloskey, 1975). Os efeitos da atividade dos quimiorreceptores periféricos sobre o sistema respiratório são bem documentados na literatura, e há evidências em ratos que a atividade expiratória também pode ser elevada pela estimulação de tais receptores (Eldridge, 1978).

A estimulação dos barorreceptores também causa uma bradicardia reflexa, a qual é bem conhecida (Hering, 1927 *Apud* Haymet e McCloskey, 1975). Alguns estudos foram realizados para avaliar os efeitos da estimulação dos baro e quimiorreceptoras nas diferentes fases do ciclo respiratório. Tem sido mostrado que a estimulação de ambos os receptores causa bradicardia por ativação dos neurônios cardio-vagais pré-ganglionares somente nas fases pós-inspiratória ou expiratória do ciclo respiratório. Um estímulo equivalente durante a inspiração não é efetivo. Há evidências de que há certo grau de convergência destes sinais (*inputs*) no núcleo do

trato solitário (NTS). Enquanto os sinais provenientes dos barorreceptores inibem a atividade inspiratória, sinais dos quimiorreceptores periféricos estimulam potencialmente a inspiração (Spyer e Gourine, 1990).

De fato, estudos anteriores de Haymet e McCloskey (1975) investigaram a influência da estimulação dos baro e dos quimiorreceptores sobre a FC durante o ciclo respiratório em cães. Seus resultados mostraram que os estímulos dos baro e quimiorreceptores causam bradicardia reflexa quando ocorre durante a expiração, mas não influencia a FC quando estimulados durante a inspiração. Outros estudos enfocando as atividades baro e quimiorreceptoras mostraram que uma leve estimulação destes reflexos, quando aplicados durante a fase inspiratória, não promove bradicardias reflexas. Em contrapartida, quando tais estímulos são executados durante a expiração, uma pronta bradicardia pode ser observada (Davidson *et al.*, 1976). Entretanto, a bradicardia reflexa resultante da estimulação dos baro e quimiorreceptores periféricos é completamente abolida em animais com pulmões inflados, mesmo quando o estímulo é aplicado durante a expiração, sugerindo que a distensão pulmonar parece exercer um papel inibitório sobre esta integração cardiorrespiratória, em cães (Potter, 1981).

Haymet e McCloskey (1975) avaliaram o efeito da estimulação dos quimiorreceptores periféricos sobre a FC de cães durante um período de apnéia após 2 minutos de hiperventilação artificial. Seus achados mostraram que um breve estímulo dos quimiorreceptores periféricos aplicado num período tardio da apnéia foi mais efetivo em evocar bradicardia do que quando liberado no início da apnéia. Quando o estímulo foi aplicado durante o período de hiperventilação contínua artificial, este não foi efetivo em evocar bradicardia, confirmando a hipótese de que a distensão pulmonar, neste caso, causada pela hiperventilação artificial, exerce um

efeito inibitório sobre a diminuição da FC. Assim, pode-se concluir que existem interações importantes entre os sistemas cardiovascular e respiratório, não só pela proximidade anatômica dos circuitos neuronais no SNC responsáveis pelo controle de suas atividades, mas também por influências da mecânica respiratória e das alterações hemodinâmicas resultantes. Contudo, deve ser enfatizado que estes estudos foram realizados em cães sendo necessários estudos adicionais em ratas para verificarmos se estes mecanismos se comportam de forma similar.

Um outro fator a ser considerado refere-se a estimulação dos quimiorreceptores periféricos, os quais estão localizados apenas nos corpúsculos carotídeos em ratos (Sapru e Krieger, 1979). Estes receptores são ativados fisiologicamente pela hipóxia, hipercapnia e redução do pH, desencadeando alterações cardiovasculares caracterizadas por hipertensão arterial sistêmica (simpato-excitação) e bradicardia (parassimpato-excitação), bem como respostas respiratórias caracterizadas por hiperpnéia e taquipnéia (Haibara et al., 1995). Considerando o presente estudo, as respostas hipóxicas observadas nos grupos MCT e OVX+MCT poderiam estar promovendo a estimulação destes receptores, cujas respostas autonômicas quimiorreflexas estariam participando também da gênese desta disautonomia.

Por outro lado, levando-se ainda em consideração a participação dos reflexos cardiovasculares na modulação das respostas autonômicas, a participação do barorreflexo não pode ser descartada. É amplamente conhecido que este reflexo participa da regulação da pressão arterial momento-a-momento promovendo simpato-inibição, assim como parassimpato-excitação. No presente estudo, observamos uma significativa atenuação da sensibilidade (ganho) barorreflexo, tanto no grupo MCT, como no grupo OVX+MCT. Apesar do grupo OVX apresentar uma

redução deste parâmetro, esta não apresentou uma significância estatística. Estas reduções da sensibilidade barorreflexa, por sua vez, promoveriam um prejuízo da modulação autonômica, resultando em simpato-excitação, bem como inibição do componente parassimpático, as quais poderiam contribuir de forma significativa para as disautonomias observadas neste estudo.

Por fim, um fator que merece destaque refere-se ao papel do estrogênio na modulação autonômica ao nível do SNC. Estudos anteriores de Saleh et al. (2000) mostrou que a microinjeção de estrogênio no NTS, RVLM³ e espaço intratecal promoveu hipotensão e redução da atividade simpática e bradicardia, bem como um aumento da atividade parassimpática quando o estrogênio foi microinjetado no NTS e NA em ratas ooforectomizadas, submetidas ou não a reposição hormonal. Além disso, estudos adicionais de Saleh e Connell (2000) mostraram que estes efeitos parassimpáticos foram abolidos pela microinjeção do antagonista seletivo dos receptores de estrogênio, ICI 182,780, no NA de ratas ooforectomizadas, enquanto que a microinjeção deste antagonista no espaço intratecal bloqueou as respostas simpato-excitatórias do estrogênio. Estes estudos sugerem que este hormônio possui um papel modulador da a regulação autonômica ao nível do SNC através dos seus próprios receptores. Estes achados, no contexto do presente estudo, poderiam sugerir, por sua vez, que a inibição do componente parassimpático nos grupos ooforectomizados, seria devido a uma inibição do tônus desse componente ao nível do NA. Contudo, no grupo OVX+MCT, onde observamos o quadro mais severo de disautonomia, esta seria devido a combinação dos vários descritos previamente, ou seja, interação dos sistemas cardiorrespiratório, ativação dos quimiorreceptores

³ A sigla RVLM, originária do inglês, foi utilizada neste estudo para denominar a “Área Bulbar Ventrolateral Rostral”.

periféricos, atenuação do barorreflexo e deficiência dos hormônios sexuais femininos.

5.0 - Alterações Hemodinâmicas da HAP e Ooforectomia

As alterações hemodinâmicas promovidas pela HAP foram avaliadas funcionalmente pela medida das pressões ventriculares, pressões arteriais e de FC. Inicialmente, em relação ao VD, observamos uma elevação da PSmax nos grupos MCTs em relação aos seus respectivos grupos controles. Estes resultados estão de acordo com estudos da literatura envolvendo a HAP induzida por MCT (Nagaya et al., 2003; Nishida et al., 2004; Hongo et al., 2005; Hessel et al., 2006; Li et al., 2006). Observamos também uma diferença da PSmax entre os grupos MCTs, ou seja, o grupo ooforectomizado que recebeu MCT (OVX+MCT) apresentou valores significativamente maiores inclusive em relação ao grupo MCT. Por outro lado, deve ser salientado que o grupo OVX por si só, apresentou uma elevação da PSmax em relação ao grupo CON, sugerindo que os hormônios sexuais femininos atuariam de forma inibitória sobre o inotropismo ventricular. Poderia ser sugerido que a elevação da PSmax observada no grupo MCT foi uma consequência do aumento da pós-carga do VD em decorrência do aumento da resistência vascular arterial pulmonar (RVAP), devido a ação direta da própria MCT sobre a vasculatura pulmonar. Além disso, a ocorrência da hipóxia observada nestes animais também pode contribuir na modulação da PSmax. Estes efeitos serão discutidos a seguir.

Inicialmente, em relação aos efeitos da MCT sobre a vasculatura pulmonar, a análise morfológica pulmonar destes animais mostrou uma elevação da relação espessura da parede/lúmen devido a hipertrofia da camada média muscular e

diminuição do lúmen. Estes achados estão de acordo com outros estudos na literatura (Stenmark, et al., 2009; Nagaya, et al., 2003; Li, et al., 2006; Tofovic et al., 2008). É sabido que a MCT é um alcalóide que atua preferencialmente sobre o endotélio arterial pulmonar, lesando-o (Lafranconi et al., 1984; Yan et al., 1996) e causando o espessamento das arteríolas pulmonares. Com isso, ocorre um aumento da resistência ao fluxo sanguíneo pulmonar, que por sua vez promove um aumento das pressões da câmara cardíaca direita. Este aumento de pós-carga promove cronicamente alterações estruturais desta câmara, levando aos sinais característicos da HAP, ou seja, hipertrofia de VD, aumento da PSmax, fadiga, dispnéia e síncope. Contudo, o mecanismo preciso pelo qual a MCT promove estas alterações ainda não é conhecido. Recentes experimentos do nosso laboratório mostraram que a hipertrofia da camada média foi revertida em ratos SHR tratados com MCT pelo tratamento crônico com captopril, o que sugere que o sistema renina angiotensina pode estar envolvido nestas respostas (dados não publicados).

Por outro lado, a hipóxia observada nos grupos MCTs é outro fator que deve ser considerado como coadjuvante para o aumento da RVAP. A análise gasométrica mostrou ainda que neste grupo ocorre também uma diminuição significativa da percentagem de saturação de hemoglobina. Estes achados também foram relatados anteriormente por Lai et al. (1991) e Schermuly et al. (2005) em ratos com HAP induzida pela MCT.

Sabe-se que a exposição prolongada à hipóxia alveolar está associada como o 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 RVAP, 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 sanguíneo, acarretando assim a hipoxemia, como observado nestes animais.

Tem sido sugerido que a hipoxemia promove a constrição destes vasos através de um mecanismo que se inicia pela inibição de canais de K^+ , seguido da despolarização da membrana celular e consequente entrada de Ca^{++} através de canais tipo L (Ward et al, 2004). Estudos de Yuan et al (1993) já haviam descrito estes efeitos sobre os canais de K^+ voltagem-dependentes na hipóxia aguda, inclusive sobre as células musculares lisas da artéria pulmonar de ratos, porém não em artérias sistêmicas (mesentéricas e renais). Estudos mais recentes de Archer et al (2001) identificaram estes canais de K^+ como sendo do tipo $Kv1.5$ sensíveis a hipóxia nas células musculares lisas das artérias pulmonares. Além disso, outros estudos demonstraram que a hipóxia crônica reduz significativamente a expressão destes canais de K^+ (Platoshyn et al., 2001; Michelakis et al., 2002; Pozeg et al. 2003).

Contudo, sabemos que a resposta à hipóxia é diferenciada para a vasculatura pulmonar, se considerarmos que periféricamente a hipóxia crônica promove uma resposta vasodilatadora (Ward et al, 2004). Esta vasoconstrição pulmonar mediada pela hipóxia poderia ser um fator que, se somado ao espessamento da camada média arteriolar, poderia estar contribuindo para o aumento da resistência pulmonar nesse modelo de HP induzida por MCT. Não pode ser descartada a possibilidade do aumento da resistência vascular provocada pela MCT também estar potencializando o quadro de hipoxemia, podendo causar um mecanismo de retroalimentação positiva.

Ainda em relação a PSmax do VD, observamos que o grupo OVX também apresentou uma elevação destes valores. Como acima mencionado, esta elevação poderia ser decorrente da ausência dos efeitos inibitórios do estrogênio sobre o coração, bem como sobre a vasculatura pulmonar.

Em relação aos efeitos do estrogênio sobre o coração, uma hipótese para explicar a elevação da PSmax do VD observada em nossos estudos seria um possível efeito inotrópico positivo causado pela ooforectomia. Este efeito foi sugerido por Johnson et al (1997) em camundongos *knockout* para receptores de estrogênio, onde foi verificado que a densidade dos canais de Ca⁺⁺ tipo L cardíacos foram aumentados pela redução dos níveis séricos de estrogênio.

Por outro lado, vários estudos têm demonstrado que o estrogênio possui uma importante ação diretamente sobre a vasculatura pulmonar. Estas ações ocorrem principalmente através dos REs localizados no endotélio vascular (Venkov et al, 1996) e nas células musculares lisas (CML) (Karas et al, 1994). Sobre o endotélio vascular, a ação não genômica do estrogênio promove um aumento na produção de ON e PGI₂ (Tostes et al, 2003). Alguns estudos demonstraram que a liberação de ON é maior em fêmeas quando comparada aos machos (Hayashi et al, 1989; Nigro et al 1990) e que a administração do 17β-estradiol em ratos SHR machos aumentou a liberação de ON em resposta ao *shear stress*⁴ (Huang, 2000). Os prováveis mecanismos envolvidos no aumento da produção de ON induzido pelo estradiol incluem: estimulação transcricional de expressão gênica da óxido nítrico sintase ON-sintase; inibição da citocina que induz a redução da expressão gênica da NO-sintase; aumento de L-arginina disponível e ativação de segundos mensageiros (AMPc e Ca⁺⁺) (Tostes et al., 2003). Assim, poderíamos supor que nos animais dos

⁴ Termo originário do inglês que significa “estresse de cisalhamento”.

grupos OVXs, a deficiência do estrogênio promoveria efeitos opostos, isto é, diminuição da produção de ON e PGI₂, e conseqüentemente, uma ausência dos efeitos vasodilatadores sobre a vasculatura pulmonar produzidas por essas substâncias. Com isso aumento da RVAP seria esperado, além de um aumento da pós-carga e, finalmente uma elevação nos valores de PSmax. Contudo, este mecanismo isoladamente não seria suficiente para causar a hipertrofia do VD no grupo OVX.

Em relação às ações do estrogênio sobre o endotélio vascular, devemos considerar ainda outros possíveis mecanismos que podem causar vasoconstrição: a) aumento da produção e liberação do FHDE; b) redução da expressão dos receptores de ET-1 pulmonar; c) diminui da formação de angiotensina II e do receptor AT-1. Contudo, deve ser salientado que na ooforectomia estas respostas são inibidas, sendo a resultante, um conjunto de respostas vasoconstritoras, as quais corroborariam ao efeito final de aumento da RVAP em resposta a ausência dos efeitos inibitórios dos hormônios sexuais femininos.

Sobre as células musculares lisas, o estrogênio pode promover vasodilatação através de diferentes mecanismos: a) efeito antagonístico não-genômico dos canais de Ca⁺⁺ e K⁺; b) efeito sobre a Rho-kinase e c) estimulação de mecanismos anti-inflamatórios. Entretanto, apesar dos vários estudos disponíveis na literatura, os efeitos do estrogênio sobre a vasculatura pulmonar não estão totalmente esclarecidos. Não obstante a este fato, suas possíveis ações não podem ser descartadas, pois na deficiência de estrogênio (ooforectomia) estes mecanismos seriam inibidos e uma resposta vasoconstritora seria esperada.

Finalmente, no grupo OVX+MCT, os valores de PSmax foram maiores que todos os demais grupos. Obviamente, estes valores elevados seriam decorrentes do conjunto das alterações promovidas pela MCT e da ooforectomia concomitantemente. Com isto, poderíamos sugerir que a ausência dos hormônios sexuais femininos agrava a instalação e o desenvolvimento da HAP neste modelo de estudo.

Um aspecto que também não pode ser descartado dentre todos os mecanismos que regulam as respostas inotrópicas positivas cardíacas é a atuação do componente simpático, o qual já foi anteriormente discutido. O fato de observarmos um aumento na atividade deste componente nos grupos MCT, OVX e OVX+MCT deve ser considerado e poderia justificar, ao menos em parte, os aumentos de PSmax do VD observado nestes grupos.

A avaliação da Psmax do VE mostrou que a instalação da HAP isoladamente (grupo MCT) não promoveu alterações em relação ao grupo CON, assim como dos parâmetros PDI e PDF. Entretanto, uma elevação da PSmax foi observada no grupo OVX. Como acima mencionado, esta resposta poderia ser decorrente do aumento da expressão dos canais de cálcio do tipo L ocasionada pela redução dos níveis de estrogênio. O grupo OVX+MCT, por sua vez, apresentou valores significativamente menores quando comparado a seu respectivo grupo controle. Uma possível explicação seria a existência de um quadro de insuficiência cardíaca, o qual será discutido a seguir.

Em relação aos valores de FC e PA, nossos resultados mostraram inicialmente que os grupos MCTs apresentaram uma significativa elevação dos valores basais de FC. Algumas hipóteses para explicar estas alterações seriam: um

aumento da atividade do componente simpático e uma redução da atividade do componente cardio-vagal por ativação de circuitos neuronais respiratórios centrais, que afetam o sistema cardiovascular em resposta à hipóxia. Estes mecanismos já foram devidamente discutidos em detalhes previamente neste estudo. Para os grupos OVXs deve ser considerada ainda os efeitos cardiovasculares centrais decorrentes da deficiência de estrogênio, o que será discutido a seguir.

Sobre a pressão arterial, observamos que apenas os grupos submetidos a ooforectomia apresentaram significativas atenuações nos valores basais de PAM, PAS, PAD e PP. O fato do grupo OVX ter apresentado redução nos valores de pressão arterial em nosso estudo não é conhecido. Estudos disponíveis na literatura mostram que a ooforectomia promove, ao contrário, elevação da PA. Estudos adicionais são necessários para esclarecermos esta discrepância.

Um fato que nos chamou a atenção foram os valores de PA observados no grupo OVX+MCT. Este grupo mostrou-se diferente dos demais desde as mensurações do peso corporal, onde da 3^a para a 4^a semana apresentou uma redução do peso corporal. Se considerarmos a ooforectomia, a indução da HAP pela MCT em fêmeas, torna-se semelhante aos machos. Porém, em machos, o tempo necessário para instalação da HAP é menor, isto é, 3 semanas, enquanto que em fêmeas (não ooforectomizadas) são 4 semanas. Estudos realizados por Lee et al. (1997) em ratos tratados com MCT mostraram que na 4^a semana os animais apresentaram sinais de insuficiência cardíaca direita. Estudos posteriores de Nihei et al. (2005), por sua vez, mostraram que ratos tratados com MCT por 4 semanas também apresentaram insuficiência cardíaca direita, cuja neurotransmissão vagal, tanto pré- quanto pós-ganglionar, apresentam-se significativamente prejudicadas. Desta forma, estes estudos nos sugerem que o grupo OVX+MCT poderia também

estar apresentando um quadro de insuficiência cardíaca. Os estudos de Wang et al. (2003), os quais caracterizaram a hipertrofia e insuficiência cardíaca em ratos, corroboram as alterações de PA encontradas em nosso estudo. Contudo, também entendemos que este grupo pode se tornar um modelo experimental de insuficiência cardíaca direita decorrente de uma complicação da HAP, cujos mecanismos permanecem por serem estudados.

6.0 - Avaliação do Barorreflexo em ratas submetidas a HAP e ooforectomia

O estudo da função barorreflexa tem despertado o interesse dos pesquisadores por várias décadas e 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. Apesar deste e de outros trabalhos, pouca ênfase tem sido dada a função barorreflexa em animais com hipertrofia ventricular direita.

No presente estudo, observamos uma alteração da sensibilidade barorreflexa nos animais submetidos a MCT isoladamente (grupo MCT), bem como os animais submetidos a ooforectomia associada a MCT (grupo OVX+MCT). Isto poderia significar um fator de risco para as doenças cardíacas que envolvam aspectos relacionados à insuficiência cardíaca direita, assim como na própria HAP. Estudos anteriores em nosso laboratório realizados em ratos com HAP induzida por MCT (3 semanas) mostraram uma significativa atenuação do ganho barorreflexo (Paganotti, 2006). Alguns questionamentos a respeito da gênese desta disfunção barorreflexa na HAP permanecem por serem esclarecidos, particularmente em fêmeas.

Em estudos anteriores, a função barorreflexa foi avaliada em fêmeas ooforectomizadas (Saleh e Connel, 2000; 2003; Saleh et al., 2000A e B; 2001). Estes estudos mostraram que a ooforectomia prejudica significativamente a função barorreflexa, enquanto que a reposição hormonal de estrogênio restaura ou até mesmo facilita a ação deste reflexo. Além disso, estudos mais recentes realizados em camundongos *knockout* para RE- α e ooforectomizados mostraram que a reposição de estrogênio não facilitou a bradicardia barorreflexa induzida pela fenilefrina sugerindo que a ação facilitadora do estrogênio sobre a função deste reflexo depende deste subtipo de receptor estrogênico (Pamidimukkala et al., 2005).

Alguma hipótese para explicarmos as atenuações do ganho barorreflexo observadas no presente estudo nos animais tratados com MCT seria a interação entre reflexos cardiovasculares (baro- e quimiorreflexo) e a deficiência de estrogênio.

Em relação a primeira hipótese, fibras aferentes dos quimiorreceptores periféricos e dos barorreceptores arteriais terminam no 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 (reações de defesa) leva à inibição do barorreflexo. Em experimentos no qual a área hipotalâmica de defesa foi estimulada eletricamente, uma inibição da bradicardia e vasodilatação periférica evocada pela estimulação 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 quimiorreceptores suprimindo o componente de FC do barorreflexo também foi estudado 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 subsequente inibição da resposta bradicárdica barorreflexa. Assim, podemos sugerir que a atenuação do barorreflexo encontrado em nosso estudo, poderia ser devido à ativação do quimiorreflexo, e da consequente ativação das áreas de defesa hipotalâmicas, pela hipóxia crônica.

Por outro lado, o grupo MCT submetido a ooforectomia apresentou uma atenuação barorreflexa mais acentuada que o grupo MCT intacto. Se levarmos em conta os efeitos cardiovasculares centrais causados pela ooforectomia, esta atenuação barorreflexa poderia ser explicada pela inibição da atividade cardio-vagal, associada à ativação do quimiorreflexo pela hipóxia, como acima descrito. Deve ser considerado que se este grupo de animais (OVX+MCT) de fato apresentar uma insuficiência cardíaca, um prejuízo da atividade vagal, tanto pré- quanto pós-ganglionar, estaria associada, conforme descrito por Nihei et al. (2005). Isto agravaria ainda mais a disfunção barorreflexa.

Por fim, a importância dos hormônios sexuais femininos isoladamente na regulação da bradicardia barorreflexa poderia ser observada no grupo OVX, onde apenas o procedimento de ooforectomia foi realizado, isto é, sem HAP induzida pela MCT. Neste grupo, apesar de não observarmos uma diferença estatística, o ganho barorreflexo sofreu uma certa redução se comparado aos animais intactos (grupo CON), sugerindo que os hormônios sexuais femininos podem apresentar um importante papel na regulação reflexa da PA, como descrito por Pamidimukkala et al. (2005)

7.0 - Avaliação do reflexo Bezold-Jarisch (RBJ) em ratas submetidas à HAP e ooforectomia

A participação dos receptores cardiopulmonares 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).

Estudos prévios têm mostrado que os receptores ventriculares também podem ser excitados tanto quimicamente, como mecanicamente. As áreas ventriculares mecano-sensoriais tem 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, 1994; 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).

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 às aquelas observadas pela ativação do RBJ (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 RBJ à estimulação com serotonina e fenilbiguanida (Ferrari et al., 1984; Zanchetti e Mancia, 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 ratas tratadas com MCT.

A avaliação do RBJ em ratas com hipertrofia ventricular direita induzida por MCT do presente estudo mostrou que a resposta hipotensora, mas não a bradicárdica, induzida pela fenilbiguanida apresentou-se atenuada no grupo MCT, enquanto que no grupo OVX+MCT a resposta hipotensora, e principalmente a bradicárdica, foram atenuadas. Uma hipótese para explicar estes achados, assim como descrito em relação ao barorreflexo, seria a ausência dos efeitos dos hormônios sexuais femininos na facilitação e/ou modulação da atividade cardio-vagal, isto é, na ausência destes hormônios esta atividade encontra-se prejudicada. Contudo, estudos adicionais são necessários para elucidar o seu papel, uma vez que não existe na literatura estudos disponíveis sobre estrogênio e o RBJ.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Peso Corporal e Ooforectomia

- Os animais do grupo OVX apresentaram os valores de pesos corporais significativamente maiores ao final da 4ª semana de tratamento quando comparado aos animais dos grupos CON e OVX+MCT.
- Os animais do grupo OVX+MCT apresentou uma redução do peso corporal a partir da 3ª semana da injeção de MCT.
- Os pesos do útero dos grupos OVXs apresentaram os valores significativamente menores quando comparado aos animais dos grupos não ooforectomizados (CON e MCT).

Avaliação Cardiovascular

- Os animais dos grupos MCTs apresentaram os valores significativamente mais elevados dos pesos úmidos e secos do VD, assim como do Índice Pulmonar, quando comparados aos seus respectivos grupos controles.
- Os animais dos grupos MCTs apresentaram os valores significativamente mais elevados de PSmax, PDI, PDF, dP/dT (+) e dP/dT (-) referentes ao VD quando comparados aos seus respectivos grupos controles.
- Os valores de PSmax do VD do grupo OVX+MCT apresentaram-se significativamente maiores quando comparados ao grupo MCT. O grupo OVX também apresentou os valores de PSmax mais elevados quando comparado ao grupo CON.
- O grupo OVX apresentou os valores significativamente maiores de PSmax do VE em relação ao grupo CON.

- Os grupos MCTs apresentaram os valores significativamente mais elevados de FC quando comparado aos seus respectivos grupos controles.
- O grupo OVX+MCT apresentou os valores de PAM, PAS e PAP significativamente menores quando comparado aos grupos OVX e MCT.
- O grupo OVX apresentou os valores de PAM, PAS e PAD significativamente menores quando comparados ao grupo CON.

Avaliação Morfométrica

- Os animais dos grupos MCTs apresentaram um aumento significativo da espessura da camada média, redução do lúmen e aumento da relação parede/lúmen dos ramos distais da artéria pulmonar quando comparados aos seus respectivos grupos controles.
- Os animais dos grupos MCTs apresentaram um aumento significativo do número de vasos arteriais muscularizados quando comparados a seus respectivos grupos controles.
- Os animais dos grupos MCTs, apresentaram os aspectos morfométricos (espessura da camada média, redução do lúmen e aumento da relação parede/lúmen dos ramos distais da artéria pulmonar) semelhantes entre eles, isto é, a ooforectomia não agravou as alterações morfométricas.

Avaliação Autonômica

- Os animais dos grupos MCTs apresentaram um aumento significativo do tônus cardíaco simpático e redução do tônus cardíaco parassimpático quando comparado aos seus respectivos grupos controles.
- O grupo OVX+MCT apresentou um aumento significativo do tônus cardíaco simpático e redução do tônus cardíaco parassimpático quando comparado ao grupo MCT.
- O grupo OVX apresentou um aumento significativo do tônus cardíaco simpático e redução do tônus cardíaco parassimpático quando comparado ao grupo CON.

Avaliação Respiratória

- O registro respiratório evidenciou que o grupo OVX+MCT apresentou os valores de FR significativamente mais elevados quando comparado ao grupo OVX e os valores de V_C significativamente menores quando comparado a este mesmo grupo.
- O grupo MCT apresentou os valores de V_{min} e V_A significativamente mais elevados quando comparado o grupo CON, enquanto que o grupo OVX+MCT apresentou estes mesmos parâmetros significativamente reduzidos quando comparado ao grupo MCT.

Avaliação Gasométrica

- A avaliação gasométrica mostrou que os grupos MCTs apresentaram os valores de PaO₂ e de % Sat Hb significativamente reduzidos quando comparado aos seus respectivos grupos controles.
- O grupo OVX+MCT apresentou os valores de % Sat Hb significativamente menores quando comparado ao grupo MCT, assim como o grupo OVX apresentou este mesmo parâmetro significativamente reduzido em relação ao grupo CON.
- O grupo MCT apresentou o valor de PaCO₂ significativamente maior quando comparado ao grupo CON, enquanto que o grupo OVX+MCT, apesar de não apresentar diferença estatística, mostrou uma tendência a um aumento da PaCO₂ quando comparado ao grupo OVX.

Avaliação Reflexa

- A avaliação do barorreflexo mostrou uma atenuação significativa da sensibilidade (ganho) e da amplitude nos animais dos grupos MCTs. Esta avaliação reflexa mostrou ainda que os animais do grupo OVX+MCT apresentaram uma atenuação significativa do ganho barorreflexo quando comparado aos animais do grupo MCT.
- A avaliação do reflexo Bezold-Jarisch mostrou que a resposta hipotensora, mas não a bradicárdica, apresentou-se atenuada no grupo MCT, enquanto que no grupo OVX+MCT a resposta hipotensora, e principalmente a bradicárdica, foram atenuadas.

Nossos resultados mostraram que o tratamento por 4 semanas com MCT desenvolve um quadro de hipertensão arterial pulmonar em ratas, promovendo significativas alterações cardiovasculares, respiratórias e autonômicas, as quais são agravadas pela ooforectomia, sugerindo que os hormônios sexuais femininos possuem uma importante função protetora neste modelo de HAP.

Em relação às variáveis cardiovasculares, o aumento das pressões da câmara direita corroboram a instalação de uma hipertrofia de ventrículo direito, e apesar da ooforectomia não ter agravado esta hipertrofia ventricular, os valores pressóricos apresentaram-se mais elevados com a ooforectomia concomitante à HAP. Nossos resultados mostraram ainda que a ooforectomia por si só elevou os valores pressóricos intraventriculares. Os mecanismos cardiovasculares reflexos, que apresentaram-se alterados neste modelo, foram afetados de forma diferente entre os grupos com HAP, isto é, os animais ooforectomizados apresentaram uma maior diminuição do ganho barorreflexo e uma atenuação da resposta hipotensora e bradicárdica do reflexo Bezold-Jarisch. A disfunção autonômica encontrada nos animais com HAP, caracterizada por um aumento da atividade simpática e atenuação da atividade parassimpática, e que também foi agravada pela ooforectomia, possui um importante contexto clínico, uma vez que tais achados contribuem como um fator de risco aumentado para o infarto do miocárdio e a morte súbita. O quadro de hipoxemia observado nos animais com HAP foi acompanhado de alterações ventilatórias, como aumento da ventilação alveolar, nos animais intactos, e redução da ventilação alveolar nos animais ooforectomizados, sugerindo que os mecanismos compensatórios para atenuar o quadro de hipoxemia encontram-se prejudicados pela deficiência dos hormônios sexuais femininos.

Por fim, deve ser ressaltado ainda, que os fatores alterados aqui observados, resguardam uma grande similaridade com a clínica da HAP, o que confere a este modelo uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOUD FM, THAMES MD. Interaction of cardiovascular reflexes in circulatory control. *In: The Handbook of Physiology – The Cardiovascular System III, 19*, p. 675 – 753, 1979.
- ABENHAIM L, MORIDE Y, BRENOT F, et al. Appetite-suppressant drugs and risk of primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 335, p. 609-16, 1996.
- AGOSTINI E, CHINNOK JE, DALY MD. Functional e histological studies on the vagas nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat. *J Physiol*, v. 135, p. 182-205, 1957.
- AGRAWAL R, PRELEVIC G, CONWAY GS, PAYNE NN, et al. Serum vascular endothelial growth factor concetrations in postmenopausal woman: the effect of hormone replacement therapy. *Fertil Steril*, v. 73, p. 56-60, 2000.
- AL-ANSARI E, DU H-K, YU L, et al. Low-molecular-weight heparin inhibts hypoxic pulmonary hypertension and vascular remodeling in guinea pigs. *Chest*, v.132, p. 1898-905, 2007.
- ALBERT CM, McGOVERN BA, NEWLL JB, RUSKIN JN. Sex differences in cardiac arrest survivors. *Circulation*, v. 93, p. 1170-76, 1996.
- ARCHER SL, LONDON B, HAMPL V WU X, et al. Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel Kv1.5. *FASEB J*, v. 15, p. 1801, 2001.
- ARCHER SL, MICHELAKIS ED. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 361, p. 1864-71, 2009.
- ATKINSON C, STEWART S, UPTON PD, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation*, v. 105, p. 1672-78, 2002.

- AVIADO DM, AVIADO DG. The B-J reflex – A historical perspective of cardiopulmonary reflexes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 940, p. 48-58, 2001.
- BAKER DG, COLERIDGE HM, COLERIDGE CG. Vagal afferent C fibres from the ventricle. *In: Cardiac Receptors, edited by R. Hainsworth, C. Kidd, and R.J. Linden. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press, p. 117-137, 1979*
- BARNES PJ. Effect of beta-agonists on inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol*, v. 104, p. 10-17, 1999.
- BARTLETT DJR. Origin and regulation of spontaneous deep breaths. *Resp Physiol*, v. 12, p. 230-238, 1971.
- BOGAARD H, ABE K, NOORDEGRAAF AV, VOELKEL NF. The right ventricle under pressure. *Chest*, v. 135, p. 794-804, 2009.
- BROWN AM. Receptors under pressure. *Circ Res*, v. 46, p. 1-10, 1980.
- BROWN L, JASON M, ANDREW D, CONRAD S. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 31, n. 1, p. 108-115, 1998.
- BROWN M. Estrogen receptor molecular biology. *Hematol Oncol Clin North Am*, v. 8, p. 101-12, 1994.
- CALLE EE, MIRACLE-McMAHILL HL, THUN MJ, HEATH CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*, v. 87, p. 517-23, 1995.
- CAULIN-GLASER T, GARCÍA-CARDEÑA G, SARREL P, SESSA WC, BENDER JR. 17 β -Estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca⁺⁺ mobilization. *Circ Res*, v. 81, p. 885-92, 1997.

- CHEN EP, CRAIG DM, BITTNER IIB, et al. Pharmacological strategies for improving diastolic dysfunction in the setting of chronic pulmonary hypertension. *Circulation*, v. 97, p. 1606-12, 1998.
- CHIANCA DJ & MACHADO BH. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. *Brasilian J Med Biol Res*, v. 27, p. 775-781, 1994.
- CHOUDHRY MA, BLAND KI, CLAUDRY IH: Gender and susceptibility to sepsis following trauma. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, v. 6, p. 127-175, 2006.
- CHRISTMAN B, McPHERSON CD, NEWMAN JH, et al. Na imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 327, p. 70-75, 1992.
- 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*, v. 33, p. 87-97, 1973
- COOL CD, STEWART JS, WEHAREHA P, et al. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers: evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol*, v. 155, p. 411-19, 1999.
- COOTE JH, HILTON SM & PEREZ-GONZALEZ JF. Inhibition of the baroreceptor reflex on stimulation in the brain stem defence centre. *J Physiol*, v. 288, p. 549-560, 1979.
- CREAGER MA, CREAGER SJ. Arterial baroreflex regulation of blood pressures in patients with congestive heart failure. *J Am Col Cardiol*, v. 23, n. 2, p. 401-405, 1994.
- DALY M & SCOTT MJ. The effects of stimulation of the carotid body chemoreceptor on heart rate in the dog. *J Physiol*, v. 144, p. 148-166, 1958.
- DAVIDSON, NS, GOLDNER S, McCLOSKEY. Respiratory modulation of baroreceptor and chemoreceptor affecting heart rate and cardiac vagal efferent nerve activity. *J Physiol*, v. 259, n. 2, p. 523-530, 1976.

- DAVIE N, HALEEN SJ, UPTON PD, et al. ET_A and ET_B receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Resp Crit Care Med*, v. 165, p. 398-405, 2002.
- DE MARCO T. Pulmonary arterial hypertension and woman. *Cardiol*, v. 14, p. 312-18
- DEITCH EA, LIVINGSTON DH, LAVERY RF, et al. Hormonally active women tolerate shock-trauma better than men: A prospective study of over 4000 trauma patients. *Ann Surg*, v. 246, p. 447-453, 2007.
- DENG Z, MORSE JH, SLAGER SL, CUERVO N, et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genetics*, 67: e-pub, 2000.
- DEVEREUX R, ALONSO D & LUTAS E. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *American Journal of Cardiology*, v. 57, p. 450-458, 1986.
- DONALD DE, SHEPHERD JT. Reflexes from the heart and lungs: physiological curiosities or important regulatory mechanisms. *Cardiovascular Research*, v. 12, p. 449-469, 1978.
- DORFMULLER P, PERROS F, BALABANIAN K, HUMBERT M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, v. 22, p. 358-363, 2003.
- DRAZEN JM, TAKEBAYASHI T, LONG NC, SHORE AS. Animal models of asthma and chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy*, v. 29, n. 2, p. 37-47, 1999.
- EARLEY S & RESTA TC. Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 283, p. 86-93, 2002.
- ECKBERG DL, DRABINSKY M, BRAUNWALD E. Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. *N Engl J Med*, v. 285, p. 877-883, 1979.

- EDDAHIBI S, HUMBERT M, FADEL E, et al. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*, v. 108, p. 1141-50, 2001.
- ELDRIDGE, FL. The different respiratory effects of inspiratory and expiratory stimulations of the carotid sinus nerve and carotid body. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 99, p. 325–333, 1978.
- EVANS RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, v. 240, p. 889-95, 1988.
- FARBER HW & LOSCALZO J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 351, p. 1655-65, 2004.
- FARHAT MY, ABI-YOUNES S, RAMWELL PW. Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall. *Biochem Pharmacol*, v. 51, p. 571-576, 1996.
- FARHAT MY, CHEN M, BHATTI T, IQBAL A, CATHAPERMAL S, RAMWEL P. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. *Br. J. Pharmacol*, v. 110, p. 719-723, 1993.
- FARHAT MY, LAVIGNE MC, RAMWELL PW. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J*, v. 10, p. 615-24, 1996.
- FEHRENBACH H. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks. *Pathobiology*, v. 70, n. 5, p. 277-83, 2003.
- FEI L, ANDERSON MH, KATRITSIS D, SNEDDON J, et al. Decreased heart rate variability in survivors of sudden cardiac death not associated with coronary artery disease. *British Heart J*, v. 71, p. 16-21, 1994.
- FERRARI A, GORDON FJ, MARK AL. Impairment of cardiopulmonary baroreflexes in Dahl salt-sensitive rats fed low salt. *Am J Physiol*, v. 247, p. 119-123, 1984.

- FRANCHINI KG, KRIEGER EM, OLIVEIRA VLL. Hemodynamics of chemoreflex activation in unanesthetized rats. *Hypertension*, v. 30, p. 699-705, 1997.
- FRANCHINI KG, KRIEGER EM. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. *J Auton Nerv Syst*, v. 42, p. 63-70, 1999.
- FREAY AD, CURTIS SW, KORACH KS, RUBANYI GM. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta: role of nuclear estrogen receptor and Ca⁺⁺ uptake. *Cir Res*, v. 81, p. 242-8, 1997.
- FULTON RM, HUTCHINSON EC, JONES AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J*, v. 14, p. 413-20, 1952.
- GAINE SP, RUBIN LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, v. 352, p. 719-25, 1998.
- GARDNER SY, MCGEE JH, KODAVANTI UP, LEDBETTER A, et al. Emission-particle-induced ventilator abnormalities in a rat model of pulmonary hypertension. *Environ Health Perspect*, v. 112, n. 8, p. 872-878, 2004.
- GARGETT CE, ZAITSEVA M, BUCAK K, CHU S, FULLER PJ, ROGERS PA. 17Beta-estradiol up-regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in human myometrial microvascular endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha and -beta. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 87, p. 4341-49, 2001.
- GIADID A, SALEH D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 333, p. 214-21, 1995.
- GIADID A, YANAGISAWA M, LAMGLEBEN D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 328, p. 1732-39, 1993.
- GONZALES RJ & KANAGY NL. Endothelium-independent relaxation of vascular smooth muscle by 17beta-estradiol. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, v. 4, p. 227-234, 1999.

- GONZALES RJ, WALKER BR, KANAGY NL. 17beta-estradiol increases nitric oxide-dependent dilatation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 280, p. 555-564, 2001.
- GORDON, JB WETZEL RC, McGEADY ML, et al. Effects of indomethacin on estradiol-induced attenuation of hypoxic vasoconstriction in lamb lungs. *J Appl Physiol*, v. 61, p. 2216-21, 1986.
- GRASSI G & MANCIA G. Arterial baroreflexes and other cardiovascular reflexes in hypertension. In: *Textbook of hypertension*. Swales JD (eds). Oxford, Blackwell Sci. Pub, p. 397-408, 1994.
- GUIGNABERT C, IZIKKI M, TU LI, LIZ, et al. Transgenic mice overexpression the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res*, v. 98, p. 1323-30, 2006.
- GUNDERSEN HJG, BOYSEN M & REITH A. A comparison of semiautomatic digitizer tablet and simple point counting performance in morphometry. *Virchows Arch Cell Pathol*, v. 37, p. 317-325, 1981.
- HAIBARA AS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*, v. 8, p. 30-40, 2001.
- HAIBARA AS, COLOMBARI E, CHIANCA DA Jr, et al. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol*, v. 269, p. H1421 – H1427, 1995.
- 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*, v. 101, p. 60-67, 2002.
- HAINSWORTH R. Reflexes from the heart. *Physiological Reviews*, v. 71, n. 3, p. 617-657, 1991.

- HARDER DR & COULSON PB. Estrogen receptors e effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *Journal of Cell Physiology*, p. 100, v. 375-382, 1979.
- HARDINGHAM GE, C HAWLA S, JOHNSON CM, BADING H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, v. 385, p. 260-265, 1997.
- HART CM, BLOCK ER. Lung serotonin metabolism. *Clin Chest Med* , v. 10, p. 59-70, 1989.
- HASHIMOTO M, AKISHITA M, ETO M, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the braquial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*, v. 92, p. 3431-35, 1995.
- HAYASHI T, FUKUTU JM, IGNARRO LJ, CHAUDHURI G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 89, p. 11259-63, 1992.
- HAYMET, BT, McCLOSKEY DI. Baroreceptor and chemoreceptor influences on heart rate during the respiratory cicle in the dog. *J Physiol*, v. 245, p. 699 – 712, 1975.
- HEAD GA, McCARTY R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J Autonom Nerv Syst*, v. 21, p. 203-213, 1987.
- HEINE PA, TAYLOR JA, IWAMOTO GA, et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 23, p. 12729-34, 2000.
- HENRY RA, LU I-LI BEIGHTOL LA, ECKBERG DL. Interactions between CO₂ chemoreflexes and arterial baroreflexes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 264, p. 2177-87, 1998.
- HERING HE. Die karotissinus reflex auf Herz and Gefasse. Leipzig: Steinkopf, 1927.

- HERVÉ P, LAUNAY J, SCROBOHACI M, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*, v. 99, p. 249-54, 1995.
- HESSEL MH, STEENDIJK P, ADELB, et al. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in intact rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 291, n. 5, p. 2424-30.
- HILTON SM, The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J Exp Biol*, v. 100, p. 159-174, 1982.
- HIROSE S, HOSODA Y, FURUYA S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol Int*, v. 50, p. 472-9, 2000.
- HONGO M, MAWATARI E, SAKAI A, et al. Effects of nicorandil on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 46, p. 452-458, 2005.
- HOUSTON DS, VANHOUTTE PM. Serotonin and the vascular system: Role in health and disease, and implications for therapy. *Drugs*, v. 31, p. 149-63, 1986.
- HOWARD CV, REED MG. Unbiased stereology. *Abingdon, Oxon, UK & New York: Garland Science / BIOS Science Publishers*, 277 p., 2005.
- HUANG A, SUN D, KOLLER A, KALEY G. 17beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats. *Circulation*, v. 101, p. 94-100, 2000.
- HUMBERT M, SITBON O, SIMONNEAU GS. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 351, p. 1425-36, 2004.
- HYDER SM, NAWAZ Z, CHIAPPETA C, STANCEL GM. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*, v. 60, p. 3183-3190, 2000.

- HYDUK A, CROFT JB, AYALA C, ZHENG K, ZHENG ZJ, MENSAH GA. Pulmonary hypertension surveillance: United States, 1980-2002. *MMWR Surveill Summ.* v. 54, p. 1-28, 2005.
- IRIGOYEN MC, KRIEGER EM. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* v. 31, p. 1213-20, 1998.
- 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*, v. 279, p. 1786-95, 2000.
- JACOB HJ, ALPER RH, BRODY MJ. Peripheral mechanism regulating arterial pressure lability in rats. *Fed Proc*, v. 45, n. 4, p. 876, 1986.
- JACOB HJ, BARRES CP, MACHADO BH, BRODY MJ. Studies on neural and humoral contributions to arterial pressure lability. *Am J Med Sci*, v. 295, p. 341-345, 1988.
- JANICKI JS, RUBIN E, FISHMAN AP. Primary pulmonary hypertension. *Circulation*, v. 80, p. 1207-21, 1989.
- 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.
- JOHNSON BD, ZHENG W, KORACH K, SCHEUER T, et al. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol*, v. 110, p. 135-40, 1997.
- KAPPAGOGA CT, LINDEM RJ, SNOW HM. The effect of stretching the superior vena cava-right atrial junction on right atrial receptors in the dog. *J Physiol*, v. 227, p. 875-887, 1972.
- KARAS RH, PATTERSON BL, MENDELSON ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation*, v. 89, n. 5, p. 1943-50, 1994.

- 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*, v. 46, p. 476-484, 1980.
- KAUSER K & RUBANYI GM. Potential cellular signaling mechanisms mediating upregulation of endothelial nitric oxide production by estrogen. *J Vasc Res*, v. 34, p. 229-226, 1997.
- KAWANO H, MOTOYAMA T, KUGIYAMA K, HIRASHIMA O, et al. Menstrual cyclic variation of endothelium-dependent vasodilation of the braquial artery: possible role of estrogen and nitric oxide. *Proc Assoc Am Physicians*, v. 108, p. 473-480, 1996.
- KAWUT SM, AL-NAAMANI N, AGERSTRAND C, ROSENZWEIG EB, ROWAN C, BARST RJ, BERGMANN S, HORN EM. Determinants of right ventricular ejection fraction in pulmonary arterial hypertension. *Chest*, v. 135, p. 752-759, 2009.
- KEEGAN A, MORECROFT I, SMILLIE D, HICKS MN, MACLEAN. Contribution of the 5-HT_{1b} receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: convergin evidence using 5-HT_{1B}-receptor knockout mice and the 5-HT_{1B/1D}-receptor antagonist GR127935. *Circ Res*, v. 89, p. 1231-39, 2001.
- KIM HP, LEE JY, JEONG JK, BAE SW, LEE HK, JO I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 263, p. 257-62, 1999.
- KING A, SMITH P, HEALTH D. Ultrastructural differences between pulmonary arteriolar muscularization induced by hypoxia and monocrotaline. *Exp Mol Pathol*, v. 61, n. 1, p. 24-35, 1994.
- KIYATAKE, K, KAKUSAKA I, KASAHARA Y, QI TM, et al. Relationship between the converting ability of liver microsomes and monocrotaline-induced pulmonary hypertension in male, female and castrated male rats. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi*, v. 32, n. 2, p. 125-29, 1994.

- KRIEGER EM, NEGRAO CE. Effects of exercise training on baroreflex control of the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci*. v. 940, p. 338-47, 2001.
- KUIPER GGJM, ENMARK E, PETRO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFFSON JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 5925-30, 1996.
- KUNZE DL, KRAHUHS JM, ORLEA CJ. Direct action of norepinephrine on aortic baroreceptors of rat adventitia. *Am J Physiol*, v. 16, p. 1984.
- LAFRANCONI WM, HUXTABLE RJ. Hepatic metabolism and pulmonary toxicity of monocrotaline using isolated perfused liver and lung. *Biochem Pharmacol*, v. 33, p. 2479-84, 1984,
- LAHM T, CRISOSTOMO PR, MARKEL TA, et al. The critical role of vascular endothelial growth factor in pulmonary vascular remodeling after lung injury. *Shock*, v. 28, p. 4-14, 2007.
- LAI YL, OLSON JW, GILLESPIE MN. Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats. *J Appl Physiol*, v. 70, p. 561-566, 1991.
- LANE KB, MACHADO RD, PAUCIULO MW, THOMSON JR. Heterozygous germline mutations in *BMP2*, encoding a TGF beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet*, v. 26, n. 1, p. 81-84, 2000.
- LARUMBE MTC, ESCOBOZA JRB. Factores del sistema hemostático y función endotelial en la hipertensión pulmonar primaria. *Rev Invest Clin*, v. 46, p. 421-25, 1994.
- LATIN-HERMOSO RL, ROSENFELD CR, YUHANNA IS, GERMAN Z, CHEN Z. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol*, v. 273, p.119-126.
- LAUNAY JM, HERVE P, PEOC`H K, TOURNOIS C, et al. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med*, v. 8, p. 1129-1135, 2002.

- LEE SD, SHROYER KR, MARKHAM NE, COO CD, VOELKEL NF, TUDER RM. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*, v. 101, p. 927-34, 1998.
- LI X-Q, HONG Y, WANG Y, et al. Sertraline protects against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 33, n. 11, p. 1047-51, 2006.
- LOPES OU & PALMER JF. Proposed respiratory “gating” mechanism for cardiac slowing. *Nature*, v. 264, p. 454 – 456, 1976.
- LOUIE EK, LIN SS, REYNERTSON SL, et al. Primary pulmonary hypertension, vasculature structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation*, v. 92, p. 819-24, 1995.
- LOYD JE, BUTLER MG, FOROUD TM, CONNEALLY PM, et al. Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Criti Care Med*, v. 152, p. 93-97, 1995
- MacLEAN SL, HERVÉ P, EDDAHIBI S, ADNOT S. 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation. Receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*, v. 131, p. 161-68, 2000.
- MALAN A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and poikilotherm. *Respir Physiol*, v. 17, p. 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*, v. 29, n.6, p. 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*, v. 12, n. 4, p. 155-87, 2000.

- MARK AL, MANCIA G. Cardiopulmonary baroreflexes in humans. *Handbook of physiology. The cardiovascular system III*, chapter 2, p. 795-812, 1994.
- MARK AL. The Bezold-Jarisch reflex revisited: clinical implications of inhibitory reflexes originating in the heart. *Am Coll Cardiol*, v. 1, p. 90-102, 1983.
- MARK MD, KERBER RE. Augmentation of cardiopulmonary baroreflex control of forearm vascular resistance in borderline hypertension. *Hypertension*, v. 4, n.1, p. 39-46, 1982.
- 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*, v. 33, p. 331-340, 2000
- 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*, v. 3, p. 169- 186, 1981.
- MASUYAMA T, YAMAMOTO K & KONDO H. Evolving changes in Doppler mitral flow velocity pattern in rats with hypertensive hypertrophy. *Journal of American Cellular Cardiology*, v. 36, p. 2333-8, 2000.
- MAUAD H, GLASS ML, MACHADO BH. Effect of selective denervation of baroreceptors on pulmonary ventilation and arterial pressure lability. *Hypertension*, v. 19, p. 182-186, 1992.
- McCUBBIN JW, GREEN JH, PAGE IH. Baroreceptor function in chronic renal hypertension. *Circ Res*, v. 205-10, 1956.
- McLAUGHLIN VV, McGOON MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, v. 114, p. 1417-31, 2006.

- McMURTRY MS, BONNET S, WU X, DICK JR, et al. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res*, v. 95, p. 830-840, 2004.
- McQUILLAN LP, LEUNG GK, MARSDEN PA, KOSTYK SK, KOUREMBANAS S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol*, v. 267, n. 5, p. 1921-27, 1994.
- McQUILLAN LP, LEUNG GK, MARSDEN PA, KOSTYK SK, KOUREMBANAS S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol*, v. 267, p.1921:27, 1994.
- MEDLOCK KL, FORRESTER, SHHEHAN DM. Progesterone and estradiol interaction in the regulation of rat uterine weight and estrogen receptor concentration. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 205, n. 2, p. 146-53, 1994.
- MEENDERING JR, TORGRIMSON BN, MILLER NP, et al. Estrogen, medroxyprogesterone, acetate, endothelial function, and biomarkers of cardiovascular risk in young woman. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 294, n. 4, p. 1630-37.
- MELDRUM DR. G-protein-coupled receptor 30 mediates estrogen`s nongenomic effects after hemorrhagic shock and trauma. *Am J Pathol*, v. 170, p. 1148-51, 2007.
- MENDELSON ME & KARAS RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol*, v. 9, p. 619-26, 1994.
- MEYER FJ, LOSSNITZER D, KRISTEN AV, et al. Respiratory muscle dysfunction in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, v. 25, n.1, p. 125-30, 2005.
- MEYRELLES SS, BERNARDES CF, MODOLO RP, MILL JG, VASQUEZ EC. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. *J Auton Nerv Syst.*, v. 63, n. 3, 144-152, 1997.

- MEYRELLES SS, CABRAL AM, VASQUEZ EC. Contribuição do reflexo cardiopulmonar na regulação cardiovascular. *Arq Bras Cardio*, v. 62, n. 2, p. 123-130, 1994.
- MEYRELLES SS, MAUAD H, MATHIAS SCB, CABRAL AM, VASQUEZ EC. Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. *J Auton Nerv Syst*, v.73, p. 135-142, 1998.
- MICHELAKIS ED, WILKINS MR, RABINOVITH M. Emerging concepts and translational priorities in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, v. 118, p. 1486-95, 2008.
- MICHELAKIS, MS, McMURTRY, WU XC, DYCK JR, et al. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxia pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation*, v. 105, p. 244-250, 2002.
- 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*, p. 13-36, 1989.
- MORITA K, OGAWA Y, TOBISE K. Effect of endothelium of pulmonary artery vasoreactivity in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Jpn Circ*, v. 60, p. 585-592, 1996.
- MORTARA A, ROVERE MT, PINNA GD, MAESTRI R, et al. Arterial baroreflex modulation of heart rate in chronic heart failure: clinical and hemodynamic correlates and prognostic implications. *Circulation*, v. 96, n. 10, p. 3450-58, 1997.
- MURATA T, OTSU K, KOBAYASHI M, NOSAKA S. Inhibition of baroreflex vagal bradycardia by selective stimulation of arterial chemoreceptors in rats. *Exp. Physiol*, v. 84, p. 897-906, 1999.
- NAAZ A, ZAKROCZYMSKI M, HEINE P, et al. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm Metab Res*, v. 34, p. 758-63, 2003.

- NADAL A, ROVIRA JM, LARIBI O, et al. Rapid insulinotropic effect of 17 β -estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J*, v. 12, p. 1341-8, 1998.
- NAGAYA N, UEMATSU M, OKUMURA SHIMIZU W, ONO F, et al. Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2125-H2131, 2003.
- NAKAZAWA H, HORI M, OZAKI H, KARAKI H. Mechanisms underlying the impairment of endothelium-dependent relaxation in the pulmonary artery of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, v. 128, p. 1098-104, 1999.
- 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*, v. 109, p. 2947-2952, 2004.
- NICOLLS MR, TARASEVICIENE-STEWART L, RAI PR, et al. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J*, v. 26, p. 1110-1118, 2005.
- NIGRO D, FORTES ZB, SCIVOLETTO R, CARVALHO MHC. Stimulation release of endothelium-derived relaxing and contracting factors induced by noradrenaline in normotensive rats. *General pharmacology*, v. 21, p. 443-46, 1990.
- 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*, v. 69, p. 493-499, 2005.
- NIKOLIC I, LIU D, BELL JA, et al. Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective. *J Mol Cell Cardio*, v. 42, p. 769-780, 2007.
- NIKULA KJ, GREEN FH. Animal models of chronic bronchitis and their relevance to studies of particle-induced disease. *Inhal Toxicol*. 12 Suppl, v. 4, p. 123-53, 2000.
- NISHIDA M, HASEGAWA Y, TANIDA I, et al. Preventive effects of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in intact and ovariectomized female rats. *Eur J Pharmacol*, v. 614, p. 70-76, 2009.

- NISHIDA M, OKADA Y, AKIYOSHI K, ESHIRO K, et al. Role of endothelin ET_B receptor in pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur J Pharmacol*, v. 496, p. 159-65, 2004.
- 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*, v. 75, p. 374-7, 1995.
- NUTTALL ME, BRADBEER JN, STROUP GB, et al. Idoxifene: a novel selective estrogen receptor modulator prevents bone loss and lowers cholesterol levels in ovariectomized rats and decreases uterine weight in intact rats. *Endocrinology*, v. 139, n. 12, 5224-34, 1998.
- PAGANINI-HILL A, DWORSKY R, KRAUS RM. Hormone replacement therapy, hormone levels, and lipoprotein cholesterol concentrations in elderly women. *Am J Obstet Gynecol*, v. 174, p. 897-902, 1996.
- PAGANOTTI MT. Estudo das alterações cardiorrespiratórias em ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2006.
- PAINTAL AS. The study of ventricular pressure receptors and their role in the Bezold - Jarisch reflex. *Q J Exp Physiol*, v. 40, p. 348-363, 1995.
- PALEVSKY HI, SCHLOO BL, PIETRA GG, WEBER KT, JANICKI JS, RUBIN E, FISHMAN AP. Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation*, v. 80, n. 5, p. 1486-88, 1989.
- PAMIDIMUKKALA J, XUE B, NEWTON LG, LUBAHN DB, et al. Estrogen receptor-alpha mediates estrogen facilitation of baroreflex heart rate responses in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 288, n. 3, p. 1063-70, 2005.
- PAYNE AH e HALES DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*, v. 25, p. 947-970, 2004.

- PERROS F, DORFMULLER P, HUMBERT M. Current Insights on the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Seminars in Respiratory and critical Care Medicine*, v. 26, n. 4, p. 355-364, 2005.
- PETTERSSON K, GRANDIEN K, KUIPER GG, GUSTAFSSON JA. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor α . *Mol Endocrinol*, v. 11, p. 1486-96, 1997.
- PIRIS J, McINTYRE RLE. Length measurement by means of a grid. *J Clin Pathol*, v. 34, p. 519-523, 1981.
- PLATOSHYN O, YU Y, GOLOVINA VA, McDANIEL SS, et al. Chronic hypoxia decreases K_v channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 280, p. 801-12, 2001.
- POTTER EK. Inspiratory inhibition of vagal responses to baroreceptor and chemoreceptor stimuli in the dog. *J Physiol*, v. 316, p. 177-190, 1981.
- POZEG ZI, MICHELAKIS E, McMURTRY MS, THÉBAUD B, et al. In vivo gene transfer of O_2 -sensitive potassium channel $k_v1.5$ reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation*, v. 107, p. 2037-44, 2003.
- RAOUL W, WAGNER-BALLON O, SABER G, HULIN A, et al. Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res*, v. 8, p. 1-13, 2007.
- RAY P, GHOSH SK, ZHANG DH, RAY A. Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-Kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Lett*, v. 409, p. 79-85, 1997.
- REICHART E, BOERKMANN P, PLENAT F. Parenteral administration of trypsin triggers lung emphysema. *Eur Respir J*, v. 5, n. 7, p. 810-14, 1992.

- REMILLARD CV, YUAN JX. Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol*, v. 286, p. 49-67, 2004.
- RICH S, DANTZKER DR, AYRES SM. Primary pulmonary hypertension: a national prospective study. *Ann Intern Med*, v. 107, p. 216-23, 1987.
- RICH S. The current treatment of pulmonary arterial hypertension. *Chest*, v. 130, n. 4, p. 1198-202, 2006.
- RUBIN LJ, SIMONNEAU G, GALIE N ET AL. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, v. 43, p.5-12, 2004.
- RUBIN LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, v. 336, n. 2, p. 111-17, 1997.
- RUI He X, WANG W, CROFTON JT, SHARE L. Effects of 17 β -estradiol on sympathetic activity and pressor response to phenylephrine in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 275, p. 1202-08, 1998.
- RUNO JR & LOYD JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, v. 361, p.1533-44, 2003.
- ROSSOUW JE. Hormones, genetics factors and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, v. 53, p. 550-557, 2002.
- SAHN D, De MARIA A, KISSLO J & WEYMAN A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiography measurements. *Circulation*, v. 58, p.1072-83, 1987.
- SAKAO S, TANABE N, TATSUMI, K. The estrogen paradox in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lun Cell Mol Physiol*, v. 299, p. 435-438, 2010.
- SALEH MC & CONNELL BJ. 17-Beta-estradiol modulates baroreflex sensitivity and autonomic tone in female rats. *J Auton Nerv Syst*, v. 80, n. 3, p. 148-61, 2000.
- SALEH MC & CONNELL BJ. Estrogen-induced autonomic effects are mediated by NMDA and GABA_A receptors in the parabrachial nucleus. *Brain Res*, v.973, p. 161-70, 2003.

- SALEH MC, CONNELL BJ, SALEH TM. Acute injection of 17β -estradiol enhances cardiovascular reflexes and autonomic tone in ovariectomized female rats. *Auton Neurosci*, v. 84, p. 78-88, 2000a.
- SALEH MC, CONNELL BJ, SALEH TM. Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. *Brain Res*, v. 879, p. 105-14, 2000b.
- SALEH TM, SALEH MC, CONNELL BJ. Estrogen blocks the cardiovascular and autonomic changes following vagal stimulation in ovariectomized rats. *Auton Neurosci*, v. 88, p. 25-35, 2001.
- SAMPAIO, K.N. Papel da Substância Cinzenta Periaquedutal Dorsolateral Sobre a Regulação Aguda da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil, 2001.
- SAPRU HN & KRIEGER AJ. Carotid and aortic chemoreceptor function in rat. *Exercise Physiol*, v. 42, n. 3, p. 344-48, 1977.
- SCHERMULY RT, KREISSELMEIER KP, GHOFRANI HA, SAMIDURAI A, et al. Antiremodeling effects of Iloprost and the Dual-selective Phosphodiesterase 3/4 inhibitor Tolafentrine in chronic experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 172, p. 358-363, 2005.
- SCHLEGEL A, WANG C, KATZENELLENBOGEN BS, PESTEL RG, LISANTI MP. Caveolin-1 potentiates estrogen receptor α (ER α) signaling: caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ER α . *J Biol Chem*, v. 274, p. 33551-56, 1999.
- SCHMIDT JB, BINDER M, DEMSCHIK G, BIEGLMAYER C, REINER A. Treatment of skin aging with topical estrogens. *Int J Dermatol*, v. 35, p.669-74, 1996.
- SHEPHERD JT, MANCIA G. Reflex control of the human cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, v. 105, p. 3-100, 1986.

- SHIBATA H, SPENCER TE, ONATE SA, et al. Role of co-activators and corepressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res*, v. 52, p. 141-65, 1997.
- SIMONNEAU G, ROBBINS IM, BERGHETTI M, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, v. 54, p. 43-54, 2009.
- SITBON O, HUMBERT M, NUNES II, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol*, v. 40, p. 780-788, 2002.
- SOURANDER L, RAJALA T, HELENIUS H. Cardiovascular and cancer morbidity and mortality and sudden cardiac death in postmenopausal women on ERT. *Lancet*, v. 352, p. 1965-69, 1998.
- SPYER KM, GOURINE AV. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci*, v. 364 p. 2603 – 2610, 2009.
- SPYER KM. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. Annual Review Prize Lecture. *Journal of Physiology*, v. 474, p. 1-19. 1994.
- 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.
- SPYRIDOPOULOS I, SULLIVAN AB, KEARNEY M, ISNER JM, LOSORDO DW. Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation*, v. 95, p. 1505-14, 1997.
- STENMARK KR, MEYRICK B, GALIE N, MOOI WJ, McMURTRY IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 297, p. 1013-32, 2009.

- STORK S, VAN DER SCHOUW YT, GROBBEE DE, BOTS ML. Estrogen, inflammation and cardiovascular risk in woman: a critical appraisal. *Trends Endocrinol Metal*, v. 15, n. 2, p. 66-72.
- SUN X & KU D. Seletive right, but not left, coronary endothelial dysfunction precedes development of pulmonary hypertension and right heart hypertrophy in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 290, p. 758-64, 2006.
- SWEENEY M, YUAN JX. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels. *Respir Res*, v. 1, p. 40-48, 2000.
- SYLVESTER JT, GORDON JB, MALAMET RL, et al. Prostaglandins and estradiol-induced attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest*, v. 88, p. 252-254, 1985.
- SZABO G, SOOS P, BHRLE S, et al. Adaptation of the right ventricle to increased afterload in the chronically volume overload heart. *Ann Thorac*, v. 82, p. 989-95, 2006.
- TAKEDA-MATSUBARA Y, NAKAGAMI H, IWAI M, CUI TX, et al. Estrogen activates phosphatases and antagonizes growth-promoting effect of angiotensin II. *Hypertension*, v. 39, p. 41-45, 2002.
- TARASEVICIENE-STEWART L, KASAHARA Y, ALGER L, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*, v. 15, p. 427-38, 2001.
- THOM TJ, EPSTEIN FH. Heart disease, cancer, and stroke mortality trends and their interrelations. An international perspective. *Circulation*, v. 90, p. 574-82, 1994.
- THORÉN P. Role of cardiac vagal C-fibers in cardiovascular control. *Rev Physiol, Biochem Pharmacol*, v. 86, p. 1-94, 1980.

- TOFOVIC SP, EMAN S, MADY H, JACSON EK, MELHEM. Estradiol metabolites attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 46, p. 430-37, 2005.
- TOFOVIC SP, ZHANG X, JACSON EK, DACIC S. PETRUSEVSKA G. 2-Methoxyestradiol mediates the protective effects of estradiol in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Vasc Pharmacol*, v. 45, p. 358-367, 2006.
- TOFOVIC SP, ZHANG X, ZHU HONG, JACKSON E. 2-Ethoxyestradiol is antimitogenic and attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Vasc Pharmacol*, v. 48, p. 2008.
- TUDER RM, COOL CD, GERACI MW, et al. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 159, p. 1925-32, 1999.
- TUDER RM, GROVES B, BADESCH DB et al. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol*, v. 144, p. 275-85, 1994.
- USTINOVA EE, SCHULTZ HD. Activation of cardiac vagal afferents by oxygen-derived free radical in rats. *Cir Res*, v. 74, v. 5, p. 895-903, 1994.
- VALVERDE MA, ROJAS P, AMIGO J, et al. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*, v. 285, p. 1929-31, 1999.
- 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*, v. 30, p. 521-532, 1997.
- VENKOV CD, RANKIN AB, VAUGHAN DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation*, v. 94, n. 4, p. 727-33, 1996.

- WALDROP TG, MULLINS DC. Cardiorespiratory responses to chemical activation of right ventricular receptors. *J Appl Physiol*, v. 63, n. 2, p. 733-9, 1987.
- WALTER P, GREENE G, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 82, p. 7889-93, 1985.
- WANG XI, REN B, LIU S, SENTEX E, et al. Characterization of cardiac hypertrophy and heart. *J Appl Physiol*, v. 94, p. 752-763, 2003.
- WARD JP, SNETKOV VA, AAROSON PI. Calcium, mitochondria, and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell Calcium*, v.36, 209-20, 2004.
- WATSON CS, NORFLEET AM, PAPPAS TC, GAMETCHU B. Rapid actions of estrogens in GH₃/B6 pituitary tumor cells via a plasma membrane version of estrogen receptor- α . *Steroids*, v. 64, p. 5-13, 1999.
- WATTERS JJ, CAMPBELL JS, CUNNINGHAM MJ, KREBS EG, DORSA DM. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signaling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*, v. 138, p. 4030-33, 1997.
- WEBB P, LOPEZ GN, UHT RM, KUSHNER PJ. Tamoxifeno activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*, v. 9, p. 443-56, 1995.
- WEGORZEWSKA IN, WALTERS K, WEISER MJ, et al. Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor alpha agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol*. V. 199, n. 1, p. 67.e1-5, 2008.
- WILSON DW, SEGALL HJ, PAN LC, LAMÉ MW, ESTER JE, MORIN D. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. *Crit Rev Toxicol*, v. 22, n. 5/6, p. 307-25, 1992.
- YAN CC & HUXTABLE RJ. Quantitation of the hepatic release of metabolites of pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 127, p. 58-63, 1996.

YOUNG KA, IVESTER C, WEST J, CARR M, RODMAN DM. BMP signaling controls PASMV KV channel expression in vitro and in vivo. *Am J Physiol*, v. 290, p. 841-848, 2006.

YUAN XJ, GOLDMAN WF, TOD ML, et al. Hypoxia reduces potassium currents in culture rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol*, v. 264, 116-23, 1993.

YUAN XJ, WANG J, JUHASZOVA M, GAINED SP, RUBIN LJ. Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet*, v. 351, p.726-27, 1998.

YUYAMA H, FUJIMORI A, SANAGI M, KOAKUTSU A, et al. The orally active nonpeptide selective endothelin ET_A receptor antagonist YM598 prevents and reverses the development of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. *Eur J. Pharmacol*, v. 496, p. 129-39, 2004.

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

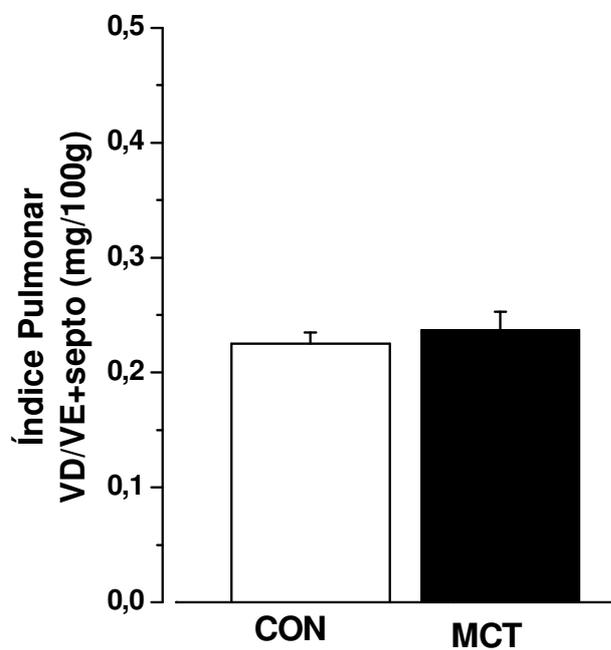
APÊNDICES

Apêndice I

Os valores absolutos dos pesos úmido e seco do VD e VE.

	CON (n=12)	MCT (n=17)	% MCT/CON	OVX (n=18)	% OVX/CON	OVX-MCT (n=12)	% OVX-MCT/OVX	% OVX-MCT/MCT
PESO CORPORAL (g)	224 ± 4	229 ± 8	2,2	302 ± 7	34,8	247 ± 7	-18,2	7,9
VD Peso Úmido (mg)	112 ± 5	217 ± 12**	93,8	127 ± 5	13,4	217 ± 19**	70,9	0,0
VD Peso Seco (mg)	30 ± 1	54 ± 3**	80,0	34 ± 1	13,3	55 ± 4**	61,8	1,9
VE Peso Úmido (mg)	471 ± 17	574 ± 20**	21,9	586 ± 12 ^{##}	24,4	579 ± 29	-1,2	0,9
VE Peso Seco (mg)	127 ± 4	151 ± 6**	18,9	155 ± 3 ^{##}	22,0	142 ± 7 ^{&}	-8,4	-6,0

APÊNDICE II



Índice Pulmonar de ratas Wistar não ooforectomizadas dos grupos controle (CON) e monocrotalina (MCT). As ratas foram tratadas com MCT por 3 semanas.

ANEXOS

ANEXO I

Tabela 1: Classificação da Hipertensão Pulmonar (Dana Point, 2008)

1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)

- 1.1. Idiopática
- 1.2. Hereditária
 - 1.2.1. BMPR2
 - 1.2.2. ALK1
- 1.3. Induzida por drogas ou toxinas
- 1.4. Associada com
 - 1.4.1 Doenças do tecido conectivo
 - 1.4.2. HIV
 - 1.4.3. Hipertensão portal
 - 1.4.4. Doenças cardíacas congênitas
 - 1.4.5. Schistosomose
 - 1.4.6. Anemia hemolítica crônica
- 1.5. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
- 1'. Doença veno-oclusiva pulmonar (DVOP)

2. Hipertensão pulmonar devido a doença do coração esquerdo

- 2.1. Disfunção sistólica
- 2.2. Disfunção diastólica
- 2.3. Doença valvular

3. Hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia

- 3.1. DPOC
- 3.2. Doença pulmonar intersticial
- 3.3. Outras doenças pulmonares combinando obstrutivas com restritivas
- 3.4. Síndrome da apnéia do sono
- 3.5. Hipoventilação alveolar
- 3.6. Exposição crônica a altas altitudes
- 3.7. Desenvolvimento de anormalidades

4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica

5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais desconhecidos

- 5.1. Desordens hematológicas
 - 5.2. Desordens sistêmicas
 - 5.3. Desordens metabólicas
 - 5.4. Outros: obstrução tumoral, mediastinite fibrosante
-

ANEXO II

Tabela 2 – Principais características histológicas da hipertensão pulmonar

Grupo 1: HAP

1.1.-1.4. Arteriopatia plexogênica pulmonar

Fase inicial:

- Hipertrofia da média
- Proliferação celular da íntima de artérias pulmonares
- Aparecimento de músculo liso em artérias que normalmente não possuem

Fase tardia:

- Fibrose laminar concêntrica da íntima
- Diminuição do volume vascular luminal
- Lesões plexiformes
- Recanalização de artérias
- Necrose fibrinóide
- Arterites

Grupo 1': DVOP

- Congestão do parênquima pulmonar
- Hemossiderose associada com áreas de congestão
- Incrustação de elastina com sais de ferro e cálcio em áreas de congestão
- Duplicação da lâmina elástica
- Fibrose obliterativa de pequenas veias e vênulas, associado com áreas de congestão
- Anormalidades contra um fundo de tecido pulmonar normal ou quase normal
- Proeminência de capilares, associado com aumento do número de capilares, em alguns casos, dificultando a distinção de hemangiomas capilar pulmonar (grupo 1.4.2)

Grupo 2: Hipertensão pulmonar com doença cardíaca esquerda

- Arterialização de grandes e médias veias pulmonares
- Edema intersticial e fibrose
- Hemossiderose
- Hipertrofia da média

Grupo 3: Hipertensão pulmonar associada a doenças pulmonares e/ou hipóxia

3.1 e 3.3.-3.5: Vasculopatia pulmonar hipóxica

- Muscularização de arteríolas
- Hipertrofia da média de artérias pulmonares
- Células musculares lisas da íntima orientadas longitudinalmente
- Leve hipertrofia da média de veias

3.2. Vasculopatia pulmonar associada com doença pulmonar intersticial

- Características de vasculopatia pulmonar hipóxica
- Fibrose excêntrica da íntima de artérias e em menor extensão de veias

Grupo 4: Hipertensão pulmonar devido a doença tromboembólica crônica ou doença embólica

- Obstrução tromboembólica de artérias pulmonares distais
- Embolismo pulmonar

Grupo 5: Hipertensão pulmonar por mecanismos multifatoriais

- Alguns mostram características de vasculopatia congestiva, alguns de características de vasculopatia pós-tromboembolismo, alguns com características combinadas.

ANEXO III**Tabela 3 – Classificação Funcional da Hipertensão pulmonar**

Classificação	Descrição
Classificação I	Hipertensão arterial pulmonar sem limitação da atividade física. A atividade física não provoca dispnéia ou fadiga, dor torácica, ou síncope.
Classificação II	Hipertensão arterial pulmonar resultando em leve limitação da atividade física. O paciente fica confortável no repouso, mas a atividade física provoca dispnéia ou fadiga, dor torácica, ou síncope.
Classificação III	Hipertensão arterial pulmonar provoca grande limitação da atividade física. O paciente fica confortável no repouso, mas pequenos esforços provocam dispnéia ou fadiga, dor torácica, ou síncope.
Classificação IV	Hipertensão arterial pulmonar provoca incapacidade de realizar qualquer atividade física sem sintomas. O paciente apresenta sinais de falência cardíaca. Dispnéia, fadiga ou ambos podem estar presentes mesmo no repouso, e o desconforto aumenta com a atividade física.

ANEXO IV**Tabela 4 - Fatores de risco para desenvolvimento da hipertensão pulmonar**

Drogas e toxinas

Confirmado

Aminorex
Fenfluramina
Dexfenfluramina
Óleo de colza

Bastante Provável

Anfetaminas
L-triptofano

Possíveis

Meta-anfetaminas
Cocaína
Agentes quimioterápicos

Desconhecido

Antidepressivos
Contraceptivos orais
Fumaça de cigarro

Condições demográficas

Confirmado

Sexo feminino

Possíveis

Gestação
Hipertensão sistêmica
Esplenectomia

Desconhecido

Obesidade

Doenças

Confirmado

Infecção por HIV

Bastante Provável

Hipertensão portal
Doenças do tecido conjuntivo (colagenoses)
Síndrome de Eisenmenger

Possíveis

Doenças da tireóide
