

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CAPTOPRIL E LOSARTAN EM RATOS
WISTAR E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS A
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR COM MONOCROTALINA**

Élio Waichert Júnior

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Universidade Federal do Espírito Santo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Vitória, Maio de 2011

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM CAPTOPRIL E LOSARTAN EM RATOS
WISTAR E ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS SUBMETIDOS A
HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR COM MONOCROTALINA**

Élio Waichert Júnior

Tese de Doutorado submetida ao programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em _____/_____/_____, por:

Prof. Dr. José Geraldo Mill – Orientador, UFES

Prof. Dr. Hélder Mauad – Coorientador, UFES

Prof. Dr. Leonardo dos Santos – Banca examinadora, UFES

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

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva – Banca examinadora, UFTM

Coordenador do PPGCF: _____
Prof. Dr. Luiz Carlos Shemberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Maio de 2011

Waichert, Junior E.

Efeitos do Tratamento com Captopril e Losartan em Ratos Wistar e Espontaneamente Hipertensos Submetidos a Hipertensão Arterial Pulmonar Com Monocrotalina.

xviii, 129 p. 29,7 cm (UFES, Dr. Ciências Fisiológicas, 2011)

Tese, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	19
METERIAL E MÉTODOS DOS PROTOCOLOS REALIZADOS.....	21
1.0 – Animais experimentais.....	22
2.0 – Grupos experimentais.....	22
3.0 – Anestesia.....	23
4.0 – Tratamento dos animais para indução da Hipertenso Pulmonar.....	23
5.0 – Tratamento com captopril e losartan.....	23
6.0 – Registros cardiovasculares.....	24
7.0 – Registros das presses das câmaras cardicas.....	25
8.0 – Registro pletismogrfico de corpo inteiro.....	26
9.0 – Cculos dos valores ventilatórios.....	29
10.0 – Fator de correção.....	30
11.0 – Outras variáveis ventilatórias estudadas.....	31
12.0 – Pesagem das câmaras cardicas.....	31
13.0 – Determinação do ndice pulmonar.....	32

14.0 – Bloqueios autonômicos.....	32
15.0 – Gasometria.....	33
16.0 – Histologia	33
17.0 – Drogas e substâncias utilizadas.....	34
18.0 Análises estatísticas.....	34
RESULTADOS.....	35
1.0 – Avaliações Hemodinâmicas.....	36
2.0 – Índice pulmonar.....	43
3.0 – Medidas das pressões intraventriculares e atriais.....	45
4.0 – Avaliações ventilatórias.....	55
5.0 – Avaliações gasométricas.....	58
6.0 – Bloqueios autonômicos.....	63
7.0 – Avaliação Histológica.....	65
DISCUSSÃO.....	78
1.0 – Avaliações hemodinâmicas.....	80
2.0 – Índice pulmonar e avaliação histológica.....	91
3.0 – Avaliação autonômica.....	95
4.0 – Avaliação Respiratória e Gasométrica.....	98
CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
ANEXOS.....	126
APÊNDICE.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Valores de PAS (mmHg), PAD (mmHg), PP (mmHg) e LPA (mmHg), dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

Tabela II - Peso corporal (g), peso úmido do VD (mg), Peso Úmido VD corrigido (mg/g), Peso Seco VD (g), Peso Seco VD corrigido (mg/g), Peso Úmido VE (mg), Peso Úmido VE corrigido (mg/g), Peso Seco VE (mg), Peso Seco VE corrigido (mg/g) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

Tabela III - P Valores de PDI de VD (mmHg), PDF de VD (mmHg), $dP/dT(+)$ de VD (mmHg/s) e $dP/dT(-)$ de VD (mmHg/s) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

Tabela IV - Valores de PDI de VE (mmHg), PDF de VE (mmHg), $dP/dT(+)$ de VE (mmHg/s) e $dP/dT(-)$ de VE (mmHg/s) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

Tabela V - Valores de FC após a administração de atenolol e atenolol + metil atropina nos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão simplificada do sistema renina angiotensina. As setas negras indicam as vias. As setas hachuradas indicam as vias deduzidas de experimentos animais e culturas de células.

Figura 2 - A expansão do sistema renina-angiotensina.

Figura 3 - Efeitos da angiotensina e da renina/prorenina mediado pelos seus respectivos receptores.

Figura 4 - Câmara pletismográfica de corpo inteiro.

Figura 5 - Valores de PAM (A) e FC (B).

Figura 6 - Valores de índice pulmonar.

Figura 7 - Valores de Pressão sistólica máxima do VD.

Figura 8 - Valores de pressão da onda "a" (A), onda "c" (B) e onda "v" (C) do átrio direito.

Figura 9 - Valores de Pressão sistólica máxima do VE.

Figura 10 - Valores de Frequência respiratória (A) e Volume corrente (B).

Figura 11 - Valores de Ventilação (min) (A) e Ventilação alveolar (B).

Figura 12 - Valores de pressão parcial de oxigênio (PaO_2) (A) e pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO_2) (B).

Figura 13 - Valores de porcentagem de saturação da hemoglobina (A), bicarbonato (HCO_3^-) (B) e potencial hidrogeniônico (pH) (C).

Figura 14 - Valores de alteração da frequência cardíaca mediante administração de atenolol e metil-atropina.

Figura 15 - Fotomicrografia demonstrando a Hipertrofia da camada média dos ramos musculares da artéria pulmonar em ratos Wistar e SHR.

Figura 16 - Fotomicrografia demonstrando o efeito do tratamento com captopril em ratos wistar e SHR com hipertensão pulmonar induzida pela injeção de monocrotalina.

Figura 17 - Fotomicrografia demonstrando o efeito do tratamento com losartan em ratos wistar e SHR com hipertensão pulmonar induzida pela injeção de monocrotalina.

Figura 18 - Fotomicrografia dos detalhes dos ramos terminais da artéria pulmonar em ratos Wistar e SHR que receberam monocrotalina e tratados três semanas após, durante duas semanas com captopril ou losartan.

Figura 19 - Valores de espessura de parede muscular em porcentagem (A), relação do diâmetro interno sobre o diâmetro externo em porcentagem (B) e relação parede sobre o lúmen.

Figura 20 – Quantidade de arteríolas observáveis por mm^2

LISTA DE ABREVIÇÕES

5-HT – 5-hidroxitriptamina

AI – Angiotensina I

AI – Angiotensina II

BMPR2 – Receptor de proteína morfogenética óssea tipo II

bpm – Batimentos por minuto

cpm – Ciclos por minuto

ET-1 – Endotelina 1

FC – Frequência cardíaca

FR – Frequência respiratória

HAP – Hipertensão arterial pulmonar

HCO₃⁻ - Íon bicarbonato

HE – Hematoxilina/eosina

HP – Hipertensão pulmonar

HPP – Hipertensão pulmonar primária

KCN – Cianeto de potássio

MCT – Monocrotalina

mmHg – Milímetros de mercúrio

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização mundial de saúde

PA – Pressão arterial

PA – Pressão arterial

P_aCO_2 – Pressão parcial de dióxido de carbono

PAM – Pressão arterial média

P_aO_2 - Pressão parcial de oxigênio

PDF – Pressão diastólica final

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDI – Pressão diastólica inicial

PGL_2 – Prostaciclina

pH – Potencial hidrogeniônico

PSmax – Pressão sistólica máxima

RVAP – Resistência vascular arterial pulmonar

Sat Hb – Saturação de hemoglobina

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

V_A – Ventilação alveolar

V_C – Volume corrente

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

Vmin – Volume minuto

Δ FC – Variação da frequência cardíaca

Δ PAM – Variação de pressão arterial média

RESUMO

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença que se inicia com o aumento da resistência das arteríolas pulmonares. Após a sua instalação, sucedem-se várias alterações sobre os sistemas cardiovascular, respiratório e autonômico. Apesar dos trabalhos disponíveis na literatura, o desenvolvimento desta doença em modelos experimentais de hipertensão arterial sistêmica permanece ainda por ser estudado, bem como os efeitos terapêuticos de bloqueadores do sistema renina-angiotensina na reversão desta doença. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos cardiovasculares, autonômicos e respiratórios promovidos pela HAP induzida pela monocrotalina (MCT) em ratos *Wistar* e SHR e os efeitos terapêuticos do tratamento crônico com captopril e losartan na reversão da HAP. Para tanto, foram utilizados ratos *Wistar* (150-180g) e SHR (150-180g), divididos nos seguintes grupos: *Wistar* controle tratado com salina ou MCT (WIS-CON-SAL e WIS-CON-MCT, respectivamente), SHR controle tratado com salina ou MCT (SHR-CON-SAL e SHR-CON-MCT, respectivamente), *Wistar* tratados com Captopril + salina ou MCT (WIS-CPT-SAL e WIS-CPT-MCT, respectivamente), SHR tratados com Captopril + salina ou MCT (SHR-CPT-SAL e SHR-MCT-CPT, respectivamente), *Wistar* tratados com Losartan + salina ou MCT (WIS-LOS-SAL e WIS-LOS-MCT, respectivamente), SHR tratados com Losartan + salina ou MCT (SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT, respectivamente). Os animais tratados com MCT receberam uma única injeção subcutânea (60 mg/Kg SC) e os controles receberam o mesmo volume de salina (~0,8 mL). Ao término da 3ª semana, quando os animais MCTs controle apresentaram HAP, foi feito o tratamento com captopril (100 mg/Kg/mL) ou losartan (30 mg/Kg/mL) na água de beber por 2 semanas no volume diário de 30 mL. Após o

tratamento com captopril ou losartan, foram realizados os registros cardiovasculares, respiratórios, gasométricos e a histologia pulmonar. Os resultados mostraram um significativo aumento do Índice Pulmonar nos animais controles tratados com MCT (*Wistar* e SHR) quando comparados com seus respectivos controles. As pressões ventriculares (PSmáx, PDI e PDF) também foram significativamente aumentadas nos grupos MCTs, bem como os valores de pressão arterial sistólica and diastólica, frequência cardíaca, pressão de pulso e labilidade da pressão arterial média. O tratamento com captopril normalizou todos os parâmetros estudados, no entanto, o losartan se mostrou ineficiente em normalizar os parâmetros hemodinâmicos. As análises morfométricas mostraram um espessamento da camada média dos dos ramos distais da artéria pulmonar e uma diminuição do lúmen nos grupos tratados com MCT. O tratamento com captopril e losartan normalizou estes parâmetros, embora o grupo tratado com losartan tenha sido menos eficaz que o captopril, pois os tratamentos mostraram diferenças significativas entre si. Quanto a avaliação autonômica, os animais MCT mostraram aumento do tônus simpático cardíaco e redução do tônus parassimpático cardíaco. Novamente, o tratamento com captopril normalizou estes parâmetros, enquanto que o losartan foi ineficaz em normalizá-los. Quanto aos parâmetros respiratórios, observamos aumentos no volume corrente, na frequência respiratória, na ventilação minuto e na ventilação alveolar dos animais controles tratados com MCT. Apenas o tratamento com captopril normalizou estes parâmetros. A avaliação gasométrica mostrou que os grupos controles tratados com MCT apresentaram redução da pressão parcial de O₂ (hipóxia), aumento da pressão parcial de CO₂ (hipercapnia), queda da porcentagem de saturação da hemoglobina (% Hb), aumento do bicarbonato (HCO₃⁻) e acidose. O tratamento com captopril normalizou todos os parâmetros gasométricos, enquanto que o mesmo não foi

observado com o losartan para os animais SHR submetidos a HAP. Nossos resultados mostraram que a MCT induziu ao quadro de HAP nos animais *Wistar* e SHR, bem como importantes alterações cardiovasculares, autonômicas, respiratórias, gasométricas e morfológicas pulmonares. Os tratamentos com captopril e losartan foram capazes de reverter a HAP em animais *Wistar* e SHR, porém, o captopril se mostrou mais eficiente em normalizar esses parâmetros quando comparados ao losartan. Estes resultados sugerem que o uso de bloqueadores do sistema renina angiotensina pode ser uma opção terapêutica para o tratamento da HAP.

Palavras chave: hipertensão arterial pulmonar; monocrotalina; SHR; captopril; losartan.

ABSTRACT

ABSTRACT

The pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease that begins with increased of pulmonary arterial resistance. After installation, several changes on the cardiovascular, respiratory and autonomic system are observed. Despite the studies available in the literature, the development of this disease in experimental models of hypertension remains to be studied, as well as the therapeutic effects of the renin angiotensin system in the reversal of this disease. The aims of the present study were to evaluate cardiovascular, autonomic and respiratory effects produced by monocrotaline (MCT)-induced PAH in *Wistar* and SHR animals and the therapeutic effects of the chronic treatment with captopril and losartan in reversing PAH. For this, we used *Wistar* (150-180 g) and SHR (150-180 g) divided into the following groups: *Wistar* control treated with saline or MCT (WIS-CON-SAL and WIS-CON-MCT, respectively), SHR control treated with saline or MCT (SHR-CON-SAL and SHR-CON-MCT, respectively), *Wistar* treated with captopril + saline or MCT (WIS-CPT-SAL and WIS-MCT-CPT, respectively), SHR treated with captopril + saline or MCT (SHR-CPT-SAL and SHR-MCT-CPT, respectively), *Wistar* treated with losartan + saline or MCT (WIS-LOS-SAL and WIS-LOS-MCT, respectively) and SHR treated with losartan + saline or MCT (SHR-LOS-SAL and SHR-LOS-MCT, respectively). In the animals treated with MCT, a single dose was injected (60 mg/Kg, SC) and control animals were submitted to a saline injection in the same volume (~0,8 mL). At the end of the 3^a week, when MCT-treated animals presented HAP, it was made the treatment with captopril (100 mg/Kg/mL) or losartan (30 mg/Kg/mL) in drinking water for 2 weeks and daily volume of 30 mL. After these treatments, cardiovascular, respiratory, gasometrical recordings and pulmonary histology were performed. Results showed a significant increase in the pulmonary index in the control animals

MCT-treated (Wistar and SHR) when compared to respective control group. The ventricular pressures (SPmax, IDP and FDP) were also significantly increased in the MCT's group, as well as systolic and diastolic blood pressure, heart rate, pressure pulse and arterial pressure lability. The treatment with captopril normalized all of parameters studied, however, losartan showed inefficient to normalize these parameters. The morphometric analysis showed an increase in the thickness of the media layer of the distal branches pulmonary arterial and a decreasing of the lumen in the MCT-treated groups. The treatment with both captopril and losartan normalized these parameters but the losartan-treated group had been less efficient than captopril, once these treatments showed significant differences each other. In relation to autonomic evaluation, the MCT-treated animals showed an increasing of the cardiac sympathetic tonus and a reduction in the parasympathetic tonus. Once more, the treatment with captopril normalized these parameters, while losartan treatment was inefficient to normalize. In relation respiratory parameters, we observed increases in the tidal volume, respiratory rate, pulmonary ventilation and alveolar ventilation in the control animals MCT-treated. Only captopril normalized these parameters. The gasometrical evaluation showed that control groups MCT-treated showed reduction in partial tension of O₂ (hypoxia), increasing in partial tension of CO₂ (hypercapnia), fall in percentage of hemoglobin saturation (% Hb), increasing in bicarbonate (HCO₃⁻) and acidosis. Captopril normalized all of these gasometrical parameters, while the same was not observed to losartan in SHR animals HAP-induced. Our results showed that MCT-induced to the HAP picture in *Wistar* and SHR animals, as well as important cardiovascular, autonomic, respiratory, gasometrical and pulmonary morphological changes. The treatments with captopril and losartan were able to reverse HAP in *Wistar* and SHR animals, however,

captopril was more effective in normalizing these parameters when compared to losartan. These results suggest that the use of blockers of the renin angiotensin system may be a therapeutic option for the treatment of PAH.

Keywords: pulmonary arterial hypertension; monocrotaline; SHR; captopril; losartan

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar (HP), até pouco tempo atrás era considerada uma doença obscura e frequentemente não identificada (Reis et al., 2010). É uma doença multifatorial que apresenta diferentes manifestações e, conseqüentemente, diferentes mecanismos patogênicos que acarretam um aumento da pressão arterial pulmonar média (PAPM). Por consenso, o valor mínimo da PAPM para ser considerada como HP é igual ou superior a 25 mmHg determinado em repouso através de cateterismo cardíaco direito (Faber e Loscalzo, 2004; Simonneau et al, 2009; Reis et al, 2010). Este valor tem sido utilizado baseado em estudos controlados e randomizados realizados por D'Alonzo et al (1991), Humbert et al (2006) e Peacock et al (2007).

O valor normal de PAPM em repouso é de 14 ± 3 mmHg e o limite superior normal é de 20,6 mmHg (Reis et al, 2010).

O aumento da PAPM ocorre devido ao aumento da resistência vascular pulmonar em indivíduos que apresentam a combinação dos fatores: vasoconstrição, remodelamento da parede vascular e trombose in situ (Rubin, 1997).

A HP foi classificada inicialmente como primária ou secundária, na 1ª Conferência Internacional sobre Hipertensão Arterial Pulmonar Primária (HAPP) realizada em 1973 e organizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). No entanto, pelo fato de existirem características histopatológicas, assim como respostas ao tratamento semelhantes entre as classificações citadas, a OMS, no 2º Simpósio Mundial de HP realizado na cidade de Evian, na França, em 1998, reclassificou a HP em 5 grupos principais baseados em critérios fisiopatológicos da doença (Runo e Loyd, 2003; Simonneau et al, 2009).

Esta classificação foi reformulada em 2003 no 3º Simpósio Mundial de HP, realizado em Veneza, na Itália (McLaughlin e McGoon, 2006) e atualizada em 2008 no 4º Simpósio Mundial sobre a doença, realizado em Dana Point, nos EUA (Simmonneau et al., 2009) (vide anexo 1), A saber: 1- Hipertensão arterial pulmonar (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.

Podemos observar que a HAP tem sido o foco da classificação da HP, desde a sua primeira classificação em 1973. A nomenclatura dos subgrupos e as condições clínicas associadas desde esta data até a última classificação feita em Dana Point (EUA) em 2008.

Além das diferenças etiológicas, a HP também foi classificada conforme as características histológicas das diferentes lesões vasculares de cada grupo (Stenmark et al., 2009). Existe ainda uma classificação funcional, baseada nos sintomas da HAP (Humbert et al., 2004).

Dentre as diferentes formas de apresentação de HP, aquela que induz a doença através de mecanismos que afetam diretamente a vasculatura pulmonar tem despertado nosso interesse. De acordo com a última classificação da HP, esta refere-se ao primeiro sub-grupo, isto é, a HAP.

A HAP é uma doença que possui um prognóstico ruim quando não tratada corretamente, e sua mortalidade varia de 20 a 40% nos 3 primeiros anos (Sitbon et al., 2002).

De acordo com um estudo sobre a prevalência desta doença, realizado pelo Centro de Controle de Doenças dos EUA, a HAP 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.

Quanto aos mecanismos patogênicos, uma característica que sempre precede o quadro de HP, ou seja, uma característica precoce da mesma é a lesão endotelial da parede das arteríolas pulmonares, que está associada a uma constrição ocasionada pelo desequilíbrio entre os fatores relaxantes e constritores do endotélio (Archer e Michelakis, 2009), que de certa forma evolui para um remodelamento vascular que é caracterizado por lesões plexiformes, hipertrofia da camada média vascular, fibrose laminar do tipo concêntrica da camada íntima, degeneração fibróide e lesões trombóticas (Runo e Loyd, 2003).

Apesar do estímulo inicial ou lesão que desencadeia a doença ser desconhecido, este pode estar relacionado com anormalidades genéticas, como a mutação de receptores de proteínas morfogenéticas ósseas tipo II (BMP2), ou fatores ambientais como drogas, vírus ou toxinas, por exemplo (Michelakis et al., 2008).

Em relação à patogenia da HAP, uma vez que existem vários 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 HAP devido à 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, 1998). A vasoconstrição hipóxica é um importante mecanismo fisiológico para otimizar a ventilação e a perfusão através da reperfusão sanguínea para áreas pulmonares que ainda estão realizando trocas gasosas (Le Cras et al., 1998). No entanto, condições de hipóxia sistêmica associadas a distúrbios respiratórios e até mesmo grandes altitudes acarretam vasoconstrição hipóxica, que pode levar a aumentos da pressão arterial no leito pulmonar (Le Cras et al., 1998). O mecanismo proposto se dá através da inibição seletiva dos canais de potássio do leito vascular pulmonar, na qual ocasionará uma despolarização e abrirá os canais de cálcio do tipo L, levando à entrada do mesmo no músculo, e conseqüentemente a liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático da musculatura lisa.

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 prostaglandinas (PGI_2) em pacientes com HAP (Christman et al., 1992); redução da expressão da PGI_2 sintase em arteríolas pulmonares (Tuder et al., 1999); redução da expressão da óxido nítrico sintase (ON-sintase) (McQuillan et al., 1994; Giadid e Saleh, 1995); aumento da expressão de receptor de endotelina do tipo 1 (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 et al., 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; 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).

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. A longo prazo, estas alterações acarretam hipertrofia ventricular direita, e conseqüentemente redução da fração de ejeção e aumento 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 se hipertrofia, 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 patogênicos da HAP. Temos observado que a maioria destes estudos são realizados em humanos, embora existam vários modelos experimentais para a indução da HAP.

Alguns modelos experimentais para o estudo das alterações cardiorrespiratórias da HP são propostos pela literatura. Alguns deles incluem a indução de bronquite, asma e quadros alérgicos por agentes irritantes inalatórios para promover a HP, tal como fumaça de cigarro, dióxido sulfúrico e endotoxinas (Drazen et al., 1999; Nikula e Green, 2000). Outros modelos promovem a HP induzindo o animal à Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) por instilação de elastase pancreática, papaína intratraqueal e inalação de agentes nocivos à injeção intravenosa de tripsina (Reichart et al., 1992; Shiraishi, 1996; Marche et al., 2000; Fehrenbach, 2003). Além destes, também são utilizados animais alterados geneticamente (Chu e et al., 2004), indução de fibrose intersticial pulmonar acompanhado de infecções (Fehrenbach, 2003) e monocrotalina (MCT) (Wilson et al., 1992).

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 às 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, 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 de este 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 às 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).

Quanto ao tratamento da HAP em humanos, vários fármacos são utilizados, tais como os anticoagulantes orais, utilizados para evitar o agravamento dos quadros onde há formação de trombos na vasculatura pulmonar, visto que a dilatação da câmara cardíaca direita, a eritrocitose secundária à hipoxemia, a ausente atividade física global e o implante de cateteres vasculares favorecem o aparecimento dos mesmos, podendo trazer efeitos devastadores ao paciente (Reis, et al., 2010).

Diuréticos também podem ser utilizados, visto que a insuficiência cardíaca direita deve ser controlada, evitando aumentos demasiados de volemia (Reis, et al., 2010). A oxigenoterapia também pode ser considerada um tratamento importante, visto que a hipoxemia é um potente vasoconstritor. A saturação de oxigênio no sangue arterial deve ser mantida acima de 90% em repouso (Reis, et al., 2010). O uso agudo de digitálicos, por sua vez, mostra evidências de melhorias do débito cardíaco em pacientes com disfunção ventricular direita causada pela HAP. No entanto seu uso crônico ainda não está estabelecido. Pode ser indicado também em pacientes com taquiarritimias supraventriculares, pelo seu efeito cronotrópico negativo (Reis, et al., 2010).

A HAP é uma doença progressiva, crônica e incurável. Nos últimos dez anos verificou-se uma grande evolução na compreensão dos mecanismos da lesão vascular pulmonar e descoberta de fármacos que vieram permitir a melhoria significativa do prognóstico da doença. Recomendações baseadas nas evidências,

que foram elaboradas por várias sociedades científicas internacionais definem hoje um tratamento padrão da HAP (Badesch et al., 2004; Simon et al., 2008). O tratamento da HAP com fármacos vasoativos tem como objetivos: o alívio dos sintomas, a melhoria da tolerância no esforço físico, o aumento da sobrevida e a melhoria da qualidade de vida.

A terapêutica disponível atualmente para o tratamento da HAP resulta em 2 grupos distintos de fármacos que são os inibidores de canais de cálcio e os fármacos vasoativos específicos.

O tratamento a longo prazo com inibidores de canais de cálcio parece ser eficaz apenas em um pequeno grupo de pacientes. Já os fármacos vasoativos utilizados são os prostanóides, visto que a prostaciclina é um potente vasodilatador com propriedades antitrombóticas. Os fármacos epoprosterol, iloprost e treprostinil são análogos da prostaciclina e podem ser administrados em perfusão contínua, por nebulização ou por via subcutânea (Sitbon et al., 2002).

Ainda sobre os fármacos vasoativos, podemos citar como terapêutica da HAP, os antagonistas dos receptores de endotelina 1 (ET-1), visto que a mesma é um potente vasoconstritor e induz a proliferação celular endotelial e muscular. Os pacientes que possuem HAP apresentam níveis altos de ET-1 (Galié et al., 2004). São reconhecidos dois sub-tipos de receptores de ET-1, o sub-tipo A (ET_A), principais responsáveis pela vasoconstrição e o sub-tipo B (ET_B), que promovem a remoção da ET-1 da circulação e podem, de certa forma, favorecer a vasodilatação. Como fármacos específicos desta classe, temos o sitaxsentan, um antagonista seletivo dos receptores ET_A e o ambrisentan, um antagonista com seletividade preferencial para os receptores da ET-1. No entanto, o bosentan, que é um

antagonista não seletivo dos receptores A e B da ET-1 é um dos mais utilizados e estudados (Rubin et al., 2002; Barst et al., 2003).

Outro fármaco vasoativo muito utilizado na HAP são os inibidores da 5' fosfodiesterase, as quais são enzimas que inativam a guanosina monofosfato cíclica (cGMP) que serve de segundo mensageiro ao óxido nítrico. Tais inibidores aumentam os níveis de cGMP, promovendo assim uma vasodilatação mediada pelo óxido nítrico. Como representante desta classe de fármacos, o sildenafil é o mais importante e estudado (Galié et al., 2005).

Contudo, os fármacos vasoativos denominados inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os bloqueadores dos receptores dos receptores AT₁ não são drogas atualmente utilizadas no tratamento da HAP, visto que esta doença apresenta uma exacerbação de todo o SRA, principalmente na vasculatura pulmonar (Lipworth, 1995). Esta classe de fármacos possui um potencial terapêutico. Existem fortes evidências de que o sistema renina angiotensina (SRA) esteja fortemente ativo nas vasculatura pulmonar em doenças como a HAP conjuntamente com a hipóxia (Marshall, P, 2003). Morrel (1995) et. al, demonstrou que em animais que sofrem de hipóxia crônica ou apresentam HAP obtiveram diminuição total da concentração de ECA, no entanto, obtiveram aumento dramático de sua concentração nas arteríolas, tornando-as mais muscularizadas, o que beneficiaria o uso dos IECA ou antagonistas dos receptores AT₁ no tratamento da HAP.

O SRA ocupa um papel muito importante no desenvolvimento da HAP pela MCT. A descoberta do SRA iniciou-se em 1898 com experimentos de Tigerstedt em coelhos, na qual relatou um aumento de pressão arterial quando extratos salinos de rins foram administrados nos animais, na qual denominaram renina. Em 1934, Henry

Goldblatt conseguiu induzir experimentalmente em cães a hipertensão arterial sistêmica através da diminuição da luz de uma das artérias renais por um clampeamento da mesma, na qual o mesmo pode concluir que níveis elevados de renina, produzidos pelo rins podem elevar dramaticamente a pressão arterial sistêmica.

O SRA é um sistema hormonal amplamente estudado, onde grandes avanços foram obtidos na década de 70 com os seus componentes clássicos circulantes, conforme a figura 1 abaixo.

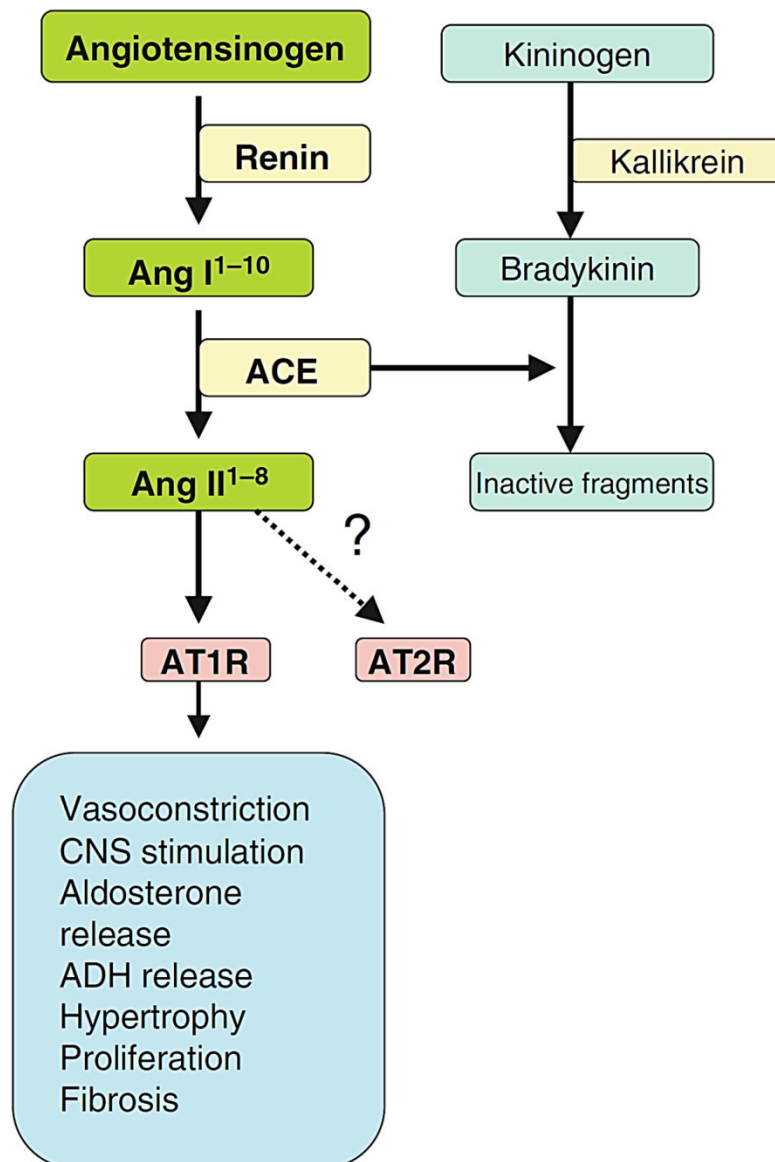


Figura 1: Visão simplificada do sistema renina-angiotensina. As setas negras indicam as vias. As setas hachuradas indicam as vias deduzidas de experimentos animais e culturas de células (reproduzido de F. Fyhrquist & O. Saijonmaa, 2008).

Esta via “clássica” tornou-se obsoleta após a descoberta de outros receptores através da clonagem dos receptores AT₁ e AT₂ (Timmermans et al., 1993). Assim as implicações fisiológicas deste sistema foi expandindo, conforme a figura 2 abaixo.

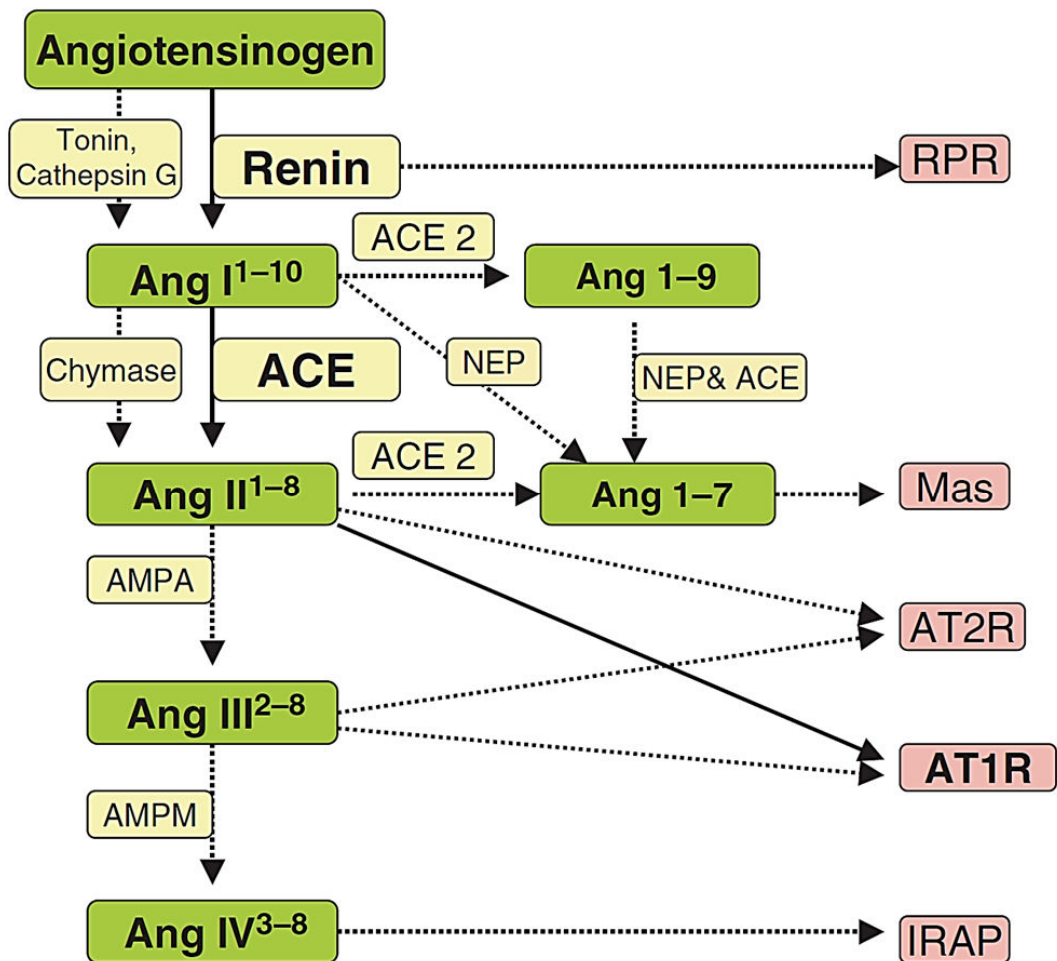


Figura 2: a figura representa a expansão do sistema renina-angiotensina. RPR, renina/pró-renina receptor; MAS, mas oncogene, receptor da angiotensina 1-7; AT2R, receptor de angiotensina tipo 2; AT1R, receptor de angiotensina tipo 1; IRAP, aminopeptidase regulado pela insulina; ANG IV mediado pelo receptor AMPA; Aminopeptidase A; AMPM, aminopeptidase M; ACE, enzima conversora de angiotensina; ACE 2, enzima conversora de angiotensina 2; NEP, endopeptidase neutra (reproduzido de F. Fyhrquist & O. Saijonmaa, 2008).

A Angiotensina II (All) é tradicionalmente reconhecida por suas funções endócrinas na regulação da resistência vascular. A All é o maior regulador de fluídos e controlador do balanço de sódio, assim como responsável pelo crescimento e remodelamento cardiovascular. Possui também efeitos diretos e indiretos nos rins, através da estimulação da síntese de aldosterona pela adrenal e interações com o sistema nervoso central (SNC) incluindo estímulos para ingestão de água, apetite ao sal e liberação do hormônio antidiurético vasopressina, além de modular a regulação autonômica da função cardiovascular (Peach et al., 1977; Saavedra, 1992; Wright e Harding, 1992).

Hoje é sabido que a via clássica para formação de All não depende exclusivamente da ECA, pois algumas vias alternativas também podem produzi-la, conforme a figura 3. A quimase é um proteoglicano secretado pelos mastócitos (Miyazaki et al., 2006). A quimase é normalmente encontrada no tecido vascular e apenas produz a angiotensina II quando há lesão na parede vascular ou situações ateroscleróticas.

A angiotensina III (AIII), por sua vez é conhecida desde 1970 e é causadora de vasoconstrição e liberação de aldosterona também, é gerada a partir da All através de uma aminopeptidase, conforme a figura 3. A angiotensina III exerce efeitos similares a angiotensina II, via receptor AT_1 e AT_2 , mas, no entanto, a angiotensina II apresenta efeitos mais pronunciados quanto à vasoconstrição e remodelamento vascular. (Zini et al., 1996). Estudos recentes demonstraram que a infusão de angiotensina II ou angiotensina III em cães acordados resulta em efeitos equipotentes de concentração no plasma com aumento da pressão arterial e secreção de aldosterona. No entanto, a eliminação da angiotensina III foi 5 vezes

mais rápida do que a angiotensina II, demonstrando que a angiotensina II apresenta um papel dominante na via “clássica” do sistema renina angiotensina aldosterona circulante.

A angiotensina IV é gerada através da angiotensina III pela aminopeptidase M conforme a figura 3. As ações da angiotensina IV são mediadas pelo receptor IRAP (insulin-regulated aminopeptidase) nas quais, incluem vasodilatação renal, regulação das funções cognitivas e está envolvida em lesões cardiovasculares (Egido et al., 2007).

A angiotensina 1-7 é considerada atualmente um componente ativo do SRA, podendo ser gerada a partir da Angiotensina I por uma via independente da ECA. A diversidade de vias enzimáticas pelas quais a Angiotensina 1-7 pode ser gerada a partir da Angiotensina I sugere que a produção desse heptapeptídeo pode ser regulada em nível tecidual (Ferrario et al., 1997). Estudos recentes propuseram que a Angiotensina 1-7 pode mediar alguns dos efeitos do tratamento com inibidores de ECA, a partir de observações em animais e cultura celular. A inibição da ECA aumenta os níveis plasmáticos de Angiotensina 1-7 (Ferrario et al., 1997; Roks et al., 1999). Estudo de Roks et al., (1999) mostrou que a Angiotensina 1-7 antagoniza a vasoconstrição induzida pela Ang II em artérias de seres humanos e inibe a ECA plasmática, cardíaca e vascular, sugerindo que a Angiotensina 1-7 seria um modulador do SRA cardiovascular em humanos. Logo, a falta de harmonização de todo este sistema contribui para o aparecimento da hipertensão arterial sistêmica. Várias evidências obtidas após a disponibilização de um antagonista específico para a Angiotensina 1-7, o A-779 [D-Ala⁷-Ang-(1-7)], indicavam a existência de um receptor específico para este peptídeo, diferente dos receptores AT1 e AT2 para Ang II (Santos et al., 1994; Ferrario et al., 1998; Santos et al., 2000). Até há alguns

anos atrás, um argumento contra o estabelecimento definitivo da Angiotensina 1-7 como componente ativo do SRA era a não identificação de um receptor próprio para este peptídeo angiotensinérgico, apesar das várias evidências farmacológicas indicarem sua presença (Fontes et al., 2000; Averill e Diz, 2000; Ito e Sved, 2000).

Contudo, Santos et al. (2003) recentemente identificou o protooncogene MAS, considerado até então um receptor acoplado à proteína G (Zohn et al., 1998), como o receptor funcional para a Angiotensina 1-7, apesar destes autores não excluírem uma interação indireta entre MAS e a Angiotensina II via receptor AT1 (Jackson et al., 1988; Ambroz et al., 199; von Bohlen und Halbach et al., 2000). Estes achados demonstraram que o receptor MAS se liga à Angiotensina 1-7 e está envolvido na mediação das ações biológicas deste peptídeo angiotensinérgico (Santos et al., 2003).

Uma outra classe de receptores também foi identificada como sendo funcional, que são os receptores de prorenina. Os receptores de prorenina são encontrados em abundância no coração, cérebro, placenta, nos rins e no fígado. Um papel importante deste receptor é a sua participação local no SRA, onde a sua ativação acarreta a produção de angiotensina II localmente (Nguyen et al; 2006, Bader et al, 2007. A figura 3 mostra resumidamente a ação e os locais de ligação dos componentes do SRA.

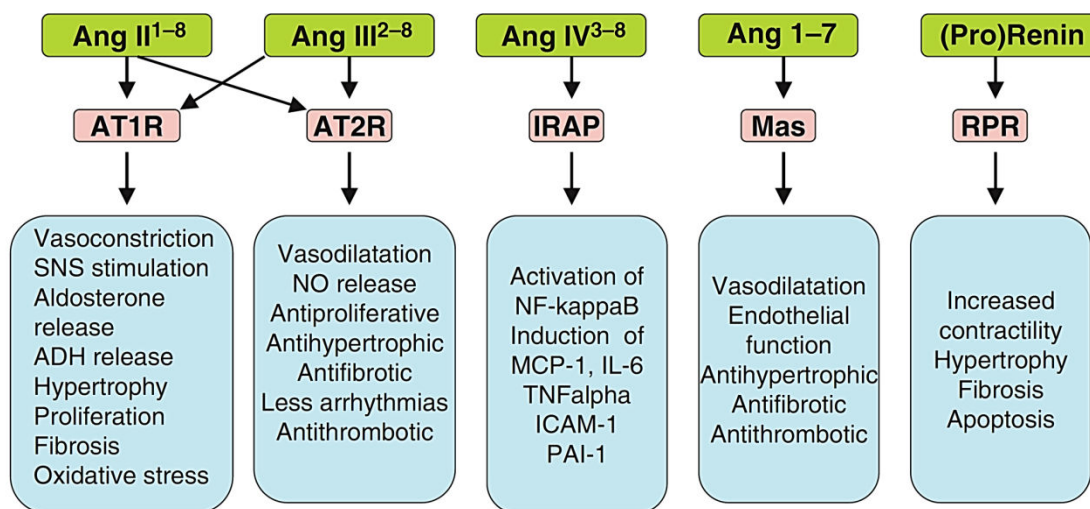


Figura 3: efeitos da angiotensina e da renina/prorenina mediado pelos seus respectivos receptores. (reproduzido de F. Fyhrquist & O. Saijonmaa, 2008).

Um dos fatores que podem agravar a HAP é a Hipertensão arterial sistêmica (HAS) atuando como uma comorbidade, visto que esta também pode apresentar uma hiperatividade do SRA. A HAS é considerada como uma das principais causas de doenças cardiovasculares. O modelo de animais escolhido para se associar a HAP e a HAS foi o modelo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), um modelo considerado análogo a HAS humana. Tal cepa de ratos foi desenvolvida a partir de cruzamento seletivo entre ratos Wistar-Kyoto. Os animais passaram a apresentar aumento da pressão arterial (PA) de geração em geração (Okamoto e Aoki, 1963). O sistema SRA desempenha uma função muito importante no desenvolvimento e

manutenção da HAS em ratos SHR (Schifrin, 1984). Dentre as alterações metabólicas encontradas nos animais SHR envolvidas com o sistema renina angiotensina, podemos citar a elevação dos níveis plasmáticos de angiotensina II (Schifrin, 1984) e o aumento de receptores de angiotensina II.

Em função da importante participação do SRA no desenvolvimento da HAP em ratos SHR, a simples indução de uma interrupção farmacológica desse sistema resulta na diminuição da HAS, bem como de suas consequências, contribuindo substancialmente para o controle da HAS (Nunez et al. 1997). Uma vez que em modelos experimentais de HAP com MCT este sistema (SRA) também encontra-se exacerbado, acreditamos que a realização de um modelo de HAP com MCT em ratos SHR, deixará o SRA ainda mais ativo do que nos modelos isoladamente (SHR ou WIS tratados com monocrotalina, e esta concomitância poderá agravar a HAP e suas consequências.

Em suma, uma vez que os animais SHR são considerados de primeira escolha para estudo da hipertensão arterial sistêmica primária, principalmente pelas alterações multifatoriais que os mesmos apresentam e pelo aumento da pressão arterial sem causa única definida, acreditamos o uso de um modelo de HAP com MCT em ratos SHR, seja ideal para o estudo de diferentes terapias farmacológicas que atuam de forma inibitória no SRA.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral:

- Estudar os efeitos promovidos pela hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida pela MCT sobre o sistema cardiorrespiratório de ratos *Wistar* e SHR submetidos ao tratamento com bloqueadores do sistema renina-angiotensina.

Específicos:

- Avaliar os efeitos cardiovasculares, autonômicos e respiratórios promovidos pela HAP induzida pela MCT em ratos *Wistar* e SHR.
- Avaliar a eficácia do tratamento com captopril e losartan em ratos *Wistar* e SHR portadores de HAP induzida pela MCT sobre os sistemas cardiovascular, autonômico e respiratório.
- Estudar as alterações anatomopatológicas da vasculatura pulmonar de ratos *Wistar* e SHR portadores de HAP induzida pela MCT submetidos ao tratamento com captopril e losartan.

MATERIAL E MÉTODOS

Material e Métodos

1.0 – Animais experimentais

Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados ratos *Wistar* e ratos SHR (abreviação em inglês de rato espontaneamente hipertenso), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo com idade padronizada de 9 semanas. Em todos os protocolos experimentais os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com controle de claro/escuro (12/12 h) e temperatura (20 – 22°C), com livre acesso à água e ração balanceada (Probiotério Primor S/A, São Paulo). Todos os experimentos foram realizados respeitando as normas de proteção aos animais.

2.0 – Grupos experimentais

Os animais utilizados neste estudo foram divididos em 12 grupos experimentais com o n de 10 animais para cada grupo:

- Wistar controle (WIS-CON-SAL);
- Wistar tratado com Monocrotalina (WIS-CON-MCT);
- SHR controle (SHR-CON-SAL);
- SHR tratados com Monocrotalina (SHR-CON-MCT);
- Wistar tratados com Captopril (WIS-CPT-SAL);
- Wistar tratados com Captopril e Monocrotalina (WIS-CPT-MCT);
- SHR tratados com Captopril (SHR-CPT-SAL);
- SHR tratados com Captopril e Monocrotalina (SHR-MCT-CPT);
- Wistar tratados com Losartan (WIS-LOS-SAL);

- Wistar tratados com Losartan e Monocrotalina (WIS-LOS-MCT);
- SHR tratados com Losartan (SHR-LOS-SAL);
- SHR tratados com Losartan e Monocrotalina (SHR-LOS-MCT);

3.0 – Anestesia

No presente estudo, o anestésico utilizado foi o hidrato de cloral (Vetec, 10%, IP) para permitir as cirurgias de cateterização da artéria e veia femorais, e cateterização das câmaras cardíacas.

4.0 - Tratamento dos animais para indução da Hipertensão Arterial Pulmonar

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) foi induzida através de uma única aplicação de monocrotalina (MCT) (Crotaline; Sigma Chemical Co), injetada de forma subcutânea, na dose de 60 mg/Kg. 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. Os experimentos nesses animais iniciaram-se 3 semanas após a aplicação da MCT, período necessário para a instalação da HAP.

5.0 – Tratamento com captopril e losartan

Após 3 semanas para a indução da HAP com MCT, os animais foram submetidos ao tratamento crônico com captopril ou losartan administrados na água de beber por 2 semanas no volume de 30mL. O captopril e o losartan foram administrados nas doses de 100 mg/Kg por dia e 30 mg/Kg por dia respectivamente. O captopril foi utilizado a fim de inibir a enzima conversora de angiotensina e o losartan para bloquear os receptores AT₁.

6.0 – Registros cardiovasculares

Para o registro direto da pressão arterial (PA), foram utilizados tubos de polietileno PE-10 (Sims Portex LTD, Kent, Inglaterra) previamente soldadas a tubos de polietileno PE-50 (CPL Medicals, São Paulo, Brasil) e o comprimento ajustado de acordo com o tamanho do animal. Estas cânulas foram inseridas na aorta abdominal, através da artéria femoral para permitir os registros de PA e administração de drogas intravenosas (IV), respectivamente. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e devidamente obstruídas com pinos de metal. Para permitir os procedimentos cirúrgicos, os animais foram previamente anestesiados e após a implantação das cânulas, estas foram exteriorizadas no dorso do animal, através de um trocáter, para permitir os registros de PA em animais não-anestesiados, com livre movimentação. Estes procedimentos foram realizados no dia anterior ao período de registros, para permitir recuperação do animal. Os animais foram mantidos em caixas individualizadas com livre acesso a água e a ração durante todo o período pós-operatório. Para os registros, o animal teve a cânula arterial previamente heparinizada (1:20) para evitar a formação de coágulos.

Para os registros de Pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) a cânula arterial foi conectada a um sistema para aquisição de dados biológicos (Power Lab) acoplado a um computador com uma frequência de amostragem de 1000 Hz.

Os valores de FC foram obtidos a partir dos sinais de PA pulsáteis. Os experimentos foram iniciados após um período de quinze minutos de adaptação do

animal ao laboratório. A pressão pulsátil (sistólica e diastólica), PAM e FC foram registradas simultaneamente. Para visualização dos registros e análise dos dados foi utilizado o software Chart V4.2 (Power Lab® ADInstruments , USA).

7.0 – Registro das pressões das câmaras cardíacas

Para os registros das pressões ventriculares e atriais, os animais foram submetidos ao implante de um tubo de polietileno (PE-50) através da artéria carótida direita para acessar o ventrículo esquerdo e permitir os registros de pressão sistólica máxima (PS_{máx}), pressão diastólica inicial (PDI), pressão diastólica final (PDF), derivada de pressão sobre o tempo positiva dP/dT(+) e derivada de pressão sobre o tempo negativa dP/dT(-). Também com o auxílio de uma PE-50, a veia jugular direita foi cateterizada para permitir o registro da pressão ventricular direita. Foram registradas as mesmas pressões descritas para o ventrículo esquerdo, isto é, PS_{máx}, PDI, PDF, dP/dT(+) e dP/dT(-). Para os registros das pressões atriais foi introduzido um cateter (PE-50) através da veia jugular. As pressões atriais registradas foram: onda “a” (sístole atrial), onda “c” (abaulamento da válvula átrio-ventricular), e onda “v” (enchimento atrial). Para os registros de pressões intracardíacas ventriculares e atriais, a cânula foi conectada a um sistema de aquisição de dados biológicos (Power Lab) acoplado a um computador como uma frequência de amostragem de 1000 Hz.

8.0 – Registro Pletismográfico de Corpo Inteiro

Para os registros pletismográficos de corpo inteiro, o animal foi colocado em uma câmara acrílica (figura 4), transparente, hermeticamente fechada, com volume de 2.095 ml. Esta câmara foi conectada a um transdutor de alta sensibilidade (modelo 270 – medical group HEWLETT PACKARD RANGE 400₂O 1734 AO2988) o qual foi conectado a um

polígrafo (HEWLETT PACKARD 7754B SYSTEM de 4 canais) acoplado a um sistema computadorizado de aquisição de dados biológicos (BIOPAC), para permitir os registros das variações de volumes ventilatórios dentro da câmara, bem como da frequência respiratória. A calibração de volumes no interior da câmara sem o animal foi feita através de uma seringa com volume de 1 ml conectada à câmara pletismográfica. Através de um tubo rígido, injeções de 0,1 e 0,2 ml de ar foram feitas com o objetivo de se obter elevações de pressão dentro da câmara, similares às observadas durante a ventilação normal do rato, as quais foram utilizadas nos cálculos dos volumes respiratórios.

No início do período de registro, os animais foram mantidos dentro da câmara por 15 a 20 minutos com a tampa aberta para permitir a sua adaptação. A seguir foram realizados 5 períodos de registros por animal, sendo que cada um teve a duração de 5 minutos. Entre estes períodos a câmara foi aberta e assim permaneceu por 1 minuto para permitir a renovação do ar da câmara.

O método de pletismográfica de corpo inteiro está baseado na Lei dos Gases; $PV=NRT$, e descrita por Mallan (1973), onde o produto da pressão (P) e do volume (V) é igual ao produto do número de moléculas (N), constante dos gases (R) e temperatura (T).

O princípio do método desta técnica baseia-se na variação de temperatura do ar expirado pelo animal a cada ciclo respiratório. Considerando-se um sistema fechado isovolumétrico, bem como as constâncias das variáveis N e R durante todo o período de registro, as variações de temperatura na câmara promovem alterações na pressão do ar dentro da câmara, o qual é detectado pelo transdutor de alta sensibilidade. As variações de temperatura são observadas porque a temperatura do ar nos pulmões do animal (38°C) é maior do que o ar que se encontra na câmara (25°C). Assim, a cada ciclo respiratório, um volume de ar (Volume Corrente) é exalado na câmara causando elevações correspondentes na temperatura e na pressão do ar na câmara. Assim, de forma mais resumida, as variações de pressão na câmara são proporcionais as do volume corrente do animal, podendo então

ser mensurado a partir dos registros efetuados. Além destes, podem também ser quantificada a frequência respiratória e a ventilação pulmonar.

Para as análises dos dados não foi utilizado o primeiro período de registro, uma vez que neste período o animal encontra-se em fase de adaptação à câmara (Mauad, 1992).



Figura 4: Câmara pletismográfica de corpo inteiro

9.0 – Cálculos dos Valores Ventilatórios

Para a quantificação dos volumes respiratórios, vários parâmetros foram considerados, de acordo com a seguinte equação:

$$V_c = V_k \cdot \frac{\Delta P_T}{\Delta P_K} \cdot \frac{T^{\circ}C}{T^{\circ}a} \cdot \frac{P_b - P_{cH_2O}}{(P_b - P_{cH_2O}) - T^{\circ}C \cdot (P_b - P_{pH_2O})} \cdot \frac{T^{\circ}P}{T^{\circ}C}$$

Onde:

V_c = volume de ar corrente (unidade = ml).

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

ΔP_T = variação de pressão dentro da câmara, na presença do animal. Este valor é obtido a partir dos registros gráficos e corresponde a um valor em centímetros de uma inspiração ou expiração. Para determinação deste, selecionou-se um segmento do registro onde o animal encontrava-se em repouso e foi feita a média aritmética de aproximadamente 10 inspirações ou expirações.

ΔP_K = 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^o_c = temperatura da câmara em oK obtida no momento do registro, após a adaptação do animal. Para isto, foi colocado um termômetro na parede interna da câmara.

T^o_a = temperatura ambiente em oK , observada por um termômetro localizado nas proximidades de onde foram feitos os registros.

T^o_p = temperatura do pulmão do animal em oK (311 oK , 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 (oC) da câmara (unidade = TORR).

P_{pH_2O} = pressão de vapor de água dos pulmões do animal determinada a partir da T (oC) dos pulmões (unidade = TORR).

10.0 – Fator de Correção

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

O fator de correção foi utilizado para que outras variáveis não pudessem interferir e desta forma alterar os valores, como por exemplo, o peso dos animais.

Onde:

$$\text{Fator de Correção} = \frac{V_{\text{CÂMARA}} - V_{\text{RATO}}}{V_{\text{CÂMARA}}}$$

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

$V_{\text{CÂMARA}}$ = Volume da câmara sem o animal (unidade = mililitros).

V_{RATO} = peso do animal (unidade = gramas).

11.0 – Outras Variáveis Ventilatórias Estudadas

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

- Ventilação Pulmonar (VP): calculada pelo produto entre o volume corrente corrigido e a frequência respiratória. Os dados foram normalizados por kg de rato.
- Espaço morto (E_M): 0,5 mL (Jalde et al., 2010)
- Ventilação alveolar (V_A): calculada pela seguinte fórmula = $(V_C - E_M) \cdot FR$

12.0 – Pesagem das câmaras cardíacas

Ao final de cada protocolo experimental, ainda sob anestesia com hidrato de cloral foi realizada uma abertura na linha média do tórax do animal para permitir o acesso e retirada do coração. As câmaras cardíacas (ventrículos direito e esquerdo) foram separadas e pesadas em balança de precisão (AND – GR-200).

O peso úmido foi obtido ao final do experimento. Para a determinação do peso seco, as câmaras foram mantidas em estufa a 100°C por um período de 24 horas para sua desidratação e posteriormente pesadas. O peso das câmaras foi corrigido pelo peso corporal dos animais.

13.0 – 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 alguns estudos de HAP (Al-Ansari et al., 2007).

14.0 – Bloqueios Autonômicos

O bloqueio autonômico foi realizado com a finalidade de avaliarmos os componentes simpáticos e parassimpáticos cardíacos, bem como auxiliar no entendimento das alterações cardiovasculares observadas. Para tanto, foi realizado o bloqueio dos adrenoreceptores β_1 com atenolol nas dose de (2mg/Kg) (IV) e dos colinorreceptores muscarínicos com metil-atropina (2mg/Kg) (IV), e as alterações de frequência cardíaca basal foram analisadas antes e após 15 minutos após cada bloqueio.

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

15.0 – Gasometria

Ao final dos experimentos, uma pequena alíquota de sangue (0,2 ml) arterial foi retirada através da cânula arterial do animal através de uma seringa previamente heparinizada para que fossem realizadas as análises de PaO₂, PaCO₂, bicarbonato de sódio (HCO₃⁻), pH e % de saturação da hemoglobina. As análises foram realizadas no aparelho (Radiometer Copenhagen ABL555) no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) no Laboratório de Urgência.

16.0 – Histologia

Os animais foram sacrificados com uma superdosagem de anestésico (hidrato de cloral) e os seus pulmões foram retirados. Após o procedimento de retirada dos pulmões, os mesmo foram perfundidos pela traqueia passivamente por gravidade

(50 cm de altura) com formol tamponado a 10%. Foram realizados cortes no lóbulo médio do pulmão direito, na qual foram adicionados em cassete, desidratados em etanol e incluídos em parafina para microtomia. Em seguida foram realizados cortes de 6 µm 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 microscópicos 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 de uma escala com os mesmos aumentos (5x e 40x) da fotomicrografias do pulmão. Para avaliarmos a espessura da parede vascular foram utilizados os valores, em micrometros, 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 de 5x. Foram contados ramos arteriais que apresentaram a muscular evidente.

17.0 – Drogas e substâncias utilizadas

- Monocrotalina (Sigma, St. Louis, EUA).
- Captopril (DEG , Índia).
- Losartan (DEG, Índia).
- Atenolol (Sigma, St. Louis, EUA).
- Metil-Atropina (Sigma, St. Louis, EUA).
- Heparina (Liquemine, Roche, RJ, Brasil).

- Hidrato de Cloral (Merck, Brasil).
- Solução Fisiológica (salina, 0,9%).

18.0 – Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como Média \pm EPM. A análise estatística foi realizada através do método de Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas de duas vias com *pos hoc* de Tukey. As significâncias estatísticas foram fixadas em $p < 0,05$.

RESULTADOS

1.0 – Avaliações hemodinâmicas

Nos gráficos e tabelas a seguir apresentamos os dados obtidos em ratos Wistar e SHR induzidos inicialmente a HAP através do tratamento com MCT (barras hachuradas) e seus respectivos controles tratados com salina (barras sólidas). Estes animais também foram submetidos ao tratamento com o inibidor da ECA, captopril (CPT), ou ao bloqueador do receptor AT_1 , losartan (LOS) ou com o veículo (água) como controle (CON).

Na figura 5 apresentamos os valores de PAM e FC dos grupos estudados. Podemos observar inicialmente que os animais SHR controle do presente estudo (SHR-CON-SAL), não submetidos à HAP ou inibidores de ECA, apresentaram valores basais de PAM significativamente maiores que o grupo WIS-CON-SAL (166 ± 2 vs 94 ± 1 mmHg, $p < 0,01$) (figura 5).

Podemos observar também que o tratamento com captopril reduziu significativamente a PAM destes grupos para valores normais (WIS-CPT-MCT= 94 ± 1 e SHR-CPT-MCT= 97 ± 1 mmHg, respectivamente), assim como do grupo SHR-CPT-SAL (96 ± 2 mmHg), mas não alterou significativamente os valores do grupo WIS-CPT-SAL (97 ± 2 mmHg).

O tratamento com losartan por sua vez, apresentou resultados semelhantes ao captopril, ou seja, normalizou os valores de PAM do grupo WIS tratados com MCT (WIS-LOS-MCT= 101 ± 6 mmHg) e SHR tratado com MCT e salina (SHR-LOS-MCT= 105 ± 4 mmHg e SHR-LOS-SAL= 104 ± 3 mmHg). O tratamento com losartan não alterou significativamente os valores de PAM no grupo WIS-LOS-SAL (97 ± 1 mmHg).

Em relação à FC (figura 5B), observamos que o tratamento com MCT promoveu um significativo aumento nos valores dos grupos WIS-CON-MCT= 411 ± 9 bpm e SHR-CON-MCT= 465 ± 14 bpm em relação aos respectivos grupos controles tratados com salina (WIS-CON-SAL= 355 ± 6 bpm e SHR-CON-SAL= 411 ± 9 bpm), os quais foram normalizados após o tratamento com captopril (WIS-CPT-MCT= 353 ± 8 bpm e SHR-CPT-MCT= 363 ± 7 bpm).

Observamos também que o captopril não alterou os valores basais de FC nos grupos tratados com salina, WIS-CPT-SAL (359 ± 6 bpm) e SHR-CPT-SAL (360 ± 6 bpm).

Resultados semelhantes foram observados com o tratamento com losartan nos grupos WIS-LOS-SAL (364 ± 4 bpm), WIS-LOS-MCT (375 ± 4 bpm) e SHR-LOS-SAL (364 ± 4) bpm, WIS-LOS-MCT (375 ± 4 bpm), SHR-LOS-SAL (371 ± 4 bpm) e SHR-LOS-MCT (364 ± 7 bpm).

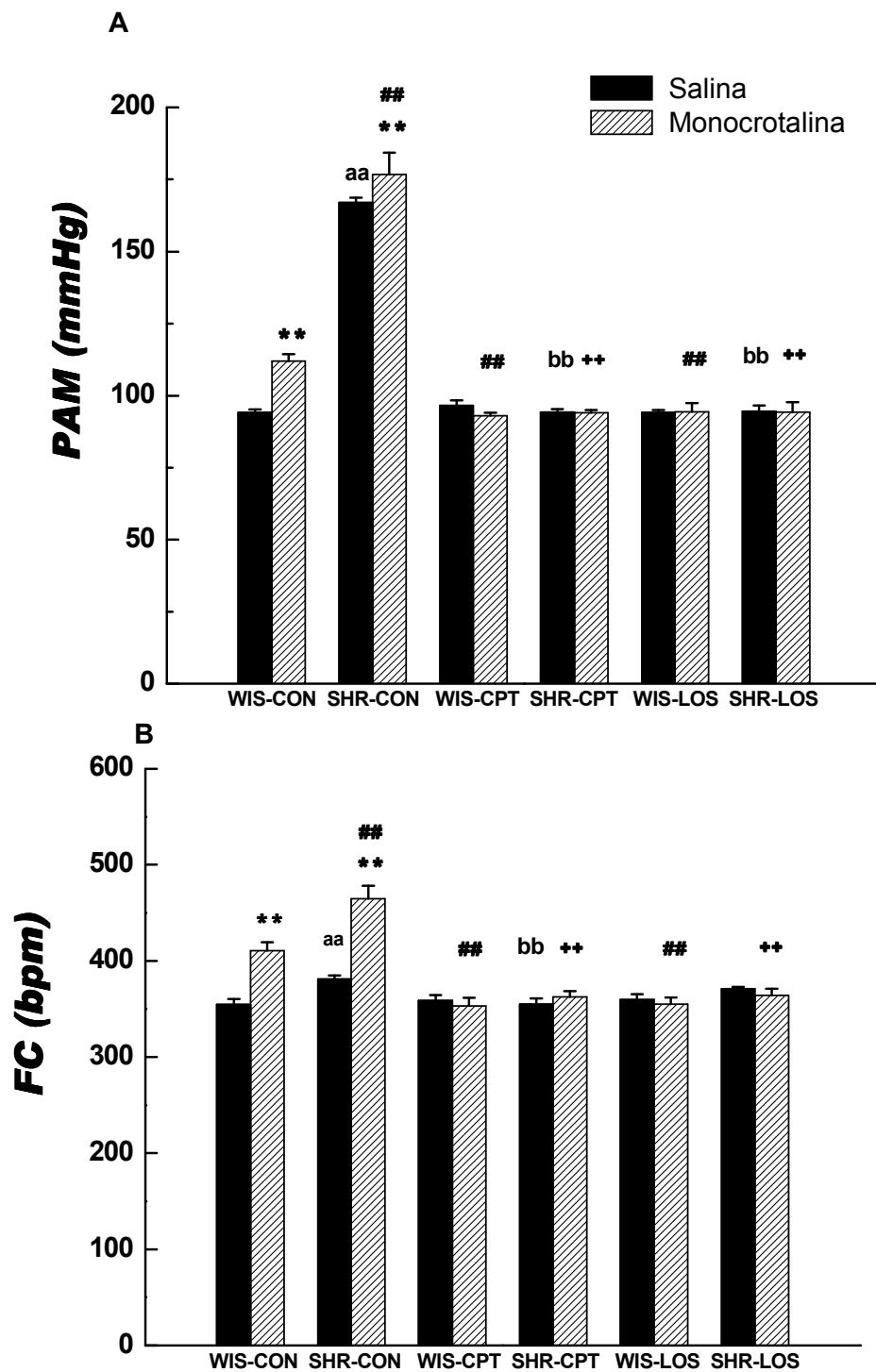


Figura 5. Valores de PAM (A) e FC (B) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu respectivo controle). ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT, ++ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT, ^{aa} $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-SAL), ^{bb} $p < 0,01$ (diferença entre o grupo SHR-CON-SAL). Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

Outros dados hemodinâmicos estão apresentados na tabela I. Podemos observar que o tratamento com MCT aumentou significativamente os valores de PAS, PAD nos grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT em relação aos grupos tratados com salina (WIS-CON-SAL e SHR-CON-SAL, respectivamente), os quais foram normalizados após os tratamentos com captopril ou losartan, inclusive os grupos SHR tratados com salina (SHR-CPT-SAL e SHR-LOS-SAL).

Tabela I - Valores de PAS (mmHg), PAD (mmHg), PP (mmHg) e LPA (mmHg), dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

	WIS-CON		SHR-CON		WIS-CPT		SHR-CPT		WIS-LOS		SHR-LOS	
	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT
PAS (mmHg)	121±2	139±3**	184±4 ^{aa}	207±4 ^{**##}	117±1	114±2 ^{##}	126±2 ^{bb}	123±3 ⁺⁺	124±1	129±6 ^{##&}	128±3 ^{bb}	121±2 ⁺⁺
PAD (mmHg)	83±1	91±1**	128±3 ^{aa}	148±3 ^{**##}	79±1	82±4 ^{##}	86±2 ^{bb}	89±2 ⁺⁺	87±2	89±3 ^{##}	90±3 ^{bb}	91±2 ⁺⁺
PP (mmHg)	38±2	47,7±1**	56±3 ^{aa}	58±3 ^{##}	43±1	39±3 ^{##}	43±4 ^{bb}	38±2 ⁺⁺	45±5	40±5 ^{##}	39±4 ^{bb}	43±2 ⁺⁺

Os valores representam a média ± EPM. **p<0,01, diferença significativa em relação aos grupos controles. ##p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT. ++p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. &p<0,05 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CPT-MCT. ^{aa}p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-SAL. ^{bb}p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-SAL. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

Na tabela II apresentamos os dados dos pesos das câmaras cardíacas. Observamos inicialmente que os grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT apresentaram perda de peso corporal em relação aos seus respectivos grupos controles tratados com salina. Podemos observar também que houve um significativo aumento nos pesos seco e úmido de VD corrigido nos grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT em relação aos respectivos grupos tratados com salina.

O tratamento com captopril, por sua vez, normalizou os valores de VD de ambos os grupos WIS e SHR tratados com MCT (WIS-CPT-MCT e SHR-CPT-MCT).

O tratamento com losartan também reduziu os valores de VD, no entanto os mesmos não foram normalizados no grupo SHR-LOS-MCT quando comparado com o grupo SHR-LOS-SAL e o grupo WIS-CON-SAL.

Tabela II - Peso corporal (g), peso úmido do VD (mg), Peso Úmido VD corrigido (mg/g), Peso Seco VD (g), Peso Seco VD corrigido (mg/g), Peso Úmido VE (mg), Peso Úmido VE corrigido (mg/g), Peso Seco VE (mg), Peso Seco VE corrigido (mg/g) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

	WIS-CON		SHR-CON		WIS-CPT		SHR-CPT		WIS-LOS		SHR-LOS	
	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT
Peso Corporal (g)	292±3	228±2**	230±0,5	224±1*	293±2	249±1**	261±5	251±2*	292±3	251±2**	249±2	249±6
PESO ÚMIDO												
VD (mg)	199±1	321±6**	202±2	382±9**aa###	200±1	204±4###	198±1	192±4**	199±1	205±3###	201±1	235±10**aa++\$\$
VD corrigido (mg/g)	0,7±0,04	1,4±0,02**	0,87±0,01 ^{aa}	1,7±0,02**aa	0,7±0,01	0,8±0,02###	0,76±0,01	0,76±0,01**	0,7±0,01	0,8±0,01###	0,8±0,02	0,93±0,03**aa++\$\$
VE (mg)	790±4	791±4	798±1	767±11	805±6	790±4	790±4	789±5	795±6	790±4	789±10	794±2
VE corrigido (mg/g)	2,7±0,02	3,4±0,01*	3,5±0,01 ^{aa}	3,4±0,01 ^{aa}	2,7±0,02###	3±0,02###	3±0,06 ^{bb}	3±0,03 ^{bb}	2,7±0,05###	2,7±0,01###	3±0,01 ^{bb}	3±0,06 ^{bb}
PESO SECO												
VD (mg)	96,3±1	214±6**	95±1	265±17**	96,5±1	96,5±1###	95,3±1	95,8±0,5**	96±1	97±1###	96±1	139±9**aa++\$\$
VD corrigido (mg/g)	0,33±0,01	0,94±0,02**	0,43±0,01 ^{aa}	1,2±0,04**aa	0,32±0,01	0,38±0,01###	0,36±0,01	0,38±0,01**	0,32±0,01	0,38±0,01###	0,39±0,01	0,55±0,03**aa++\$\$
VE (mg)	211±3	274±8**	253±2,3 ^{aa}	263±8 ^{aa}	214±3	213±3###	213±3	214±3**	212±3	213±2###	213±4	213±5**
VE corrigido (mg/g)	0,72±0,01	1,2±0,03**	1,1±0,01 ^{aa}	1,17±0,01 ^{aa}	0,73±0,01###	0,85±0,01 ^{aa###}	0,81±0,01 ^{bb}	0,85±0,01 ^{aa+bb}	0,73±0,01###	0,84±0,01 ^{aa###}	0,87±0,01 ^{aa+bb}	0,85±0,01 ^{aa+bb}

Os valores representam a média ± EPM. **p<0,01 diferença significativa em relação aos grupos controles. *p<0,05 diferença significativa em relação aos grupos controles. ###p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT. **p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. &&p<0,05 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CPT- MCT. ^{aa}p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-SAL. ^{bb}p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-SAL. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

2.0 - Determinação do índice pulmonar

Na figura 6, estão representados os valores de índice pulmonar dos animais estudados. O índice pulmonar é determinado pela razão do peso do VD seco corrigido pelo peso do VE seco mais o septo corrigido e é indicativo da instalação da HAP nos animais.

Podemos observar um significativo aumento no índice pulmonar nos animais WIS e SHR tratados com monocrotalina (WIS-CON-MCT= $0,787 \pm 0,03$ e SHR-CON-MCT= $1 \pm 0,03$) em relação aos seus respectivos grupos controles (WIS-CON-SAL= $0,456 \pm 0,04$ e SHR-CON-SAL= $0,39 \pm 0,031$).

Observamos também que o tratamento com captopril normalizou o índice pulmonar (WIS-CPT-MCT= $0,453 \pm 0,006$ e SHR-CPT-MCT= $0,447 \pm 0,006$).

Deve ser ressaltado, contudo, que no grupo SHR-LOS-MCT, embora tenha sido observada uma atenuação no índice pulmonar (SHR-LOS-MCT= $0,65 \pm 0,04$), seus valores permaneceram significativamente maiores que o respectivo grupo controle (SHR-LOS-SAL= $0,45 \pm 0,004$), assim como em relação ao grupo WIS-CON-SAL ($0,45 \pm 0,007$) e SHR-CPT-MCT ($0,44 \pm 0,006$).

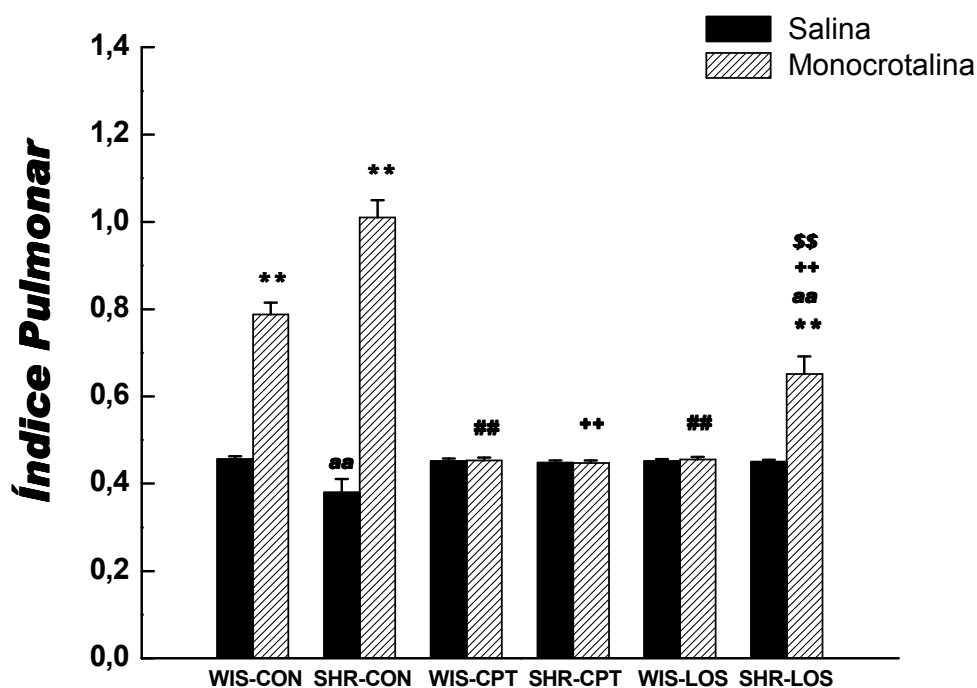


Figura 6. Valores de índice pulmonar dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT, ** $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT, \$\$\$ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT, ^{aa} $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-SAL). Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

3.0 – Medidas das pressões intraventriculares e atriais¹

Na figura 7 apresentamos os valores de PS máx de VD dos grupos estudados. Podemos observar inicialmente que o tratamento com MCT promoveu um significativo aumento nos grupos WIS-CON-MCT (51 ± 3 mmHg) e SHR-CON-MCT (59 ± 2 mmHg) quando comparados com seus grupos controles WIS-CON-SAL ($23 \pm 0,9$ mmHg) e SHR-CON-SAL ($24 \pm 0,9$ mmHg).

O tratamento com captopril por sua vez, normalizou os valores de PS máx de VD dos grupos WIS-CPT-MCT ($22 \pm 0,4$ mmHg) e SHR-CPT-MCT ($23 \pm 0,7$ mmHg).

Resultados similares foram observados com o tratamento com losartan no grupo WIS-LOS-MCT (24 ± 1 mmHg), porém no grupo SHR-LOS-MCT, embora tenha sido observada uma atenuação, seus valores permaneceram significativamente maiores que o grupo SHR-LOS-SAL (22 ± 1 mmHg), SHR-CPT-MCT ($23 \pm 0,7$ mmHg) e o grupo WIS-CON-SAL ($23 \pm 0,9$ mmHg).

¹ No apêndice 1 apresentamos registros típicos ilustrativos de ondas atriais de alguns animais deste estudo.

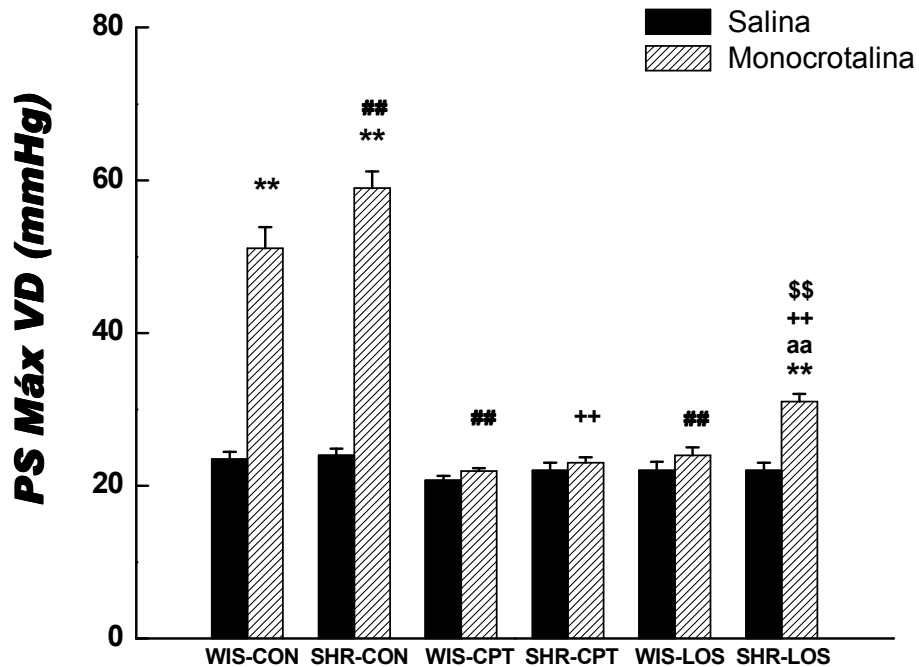


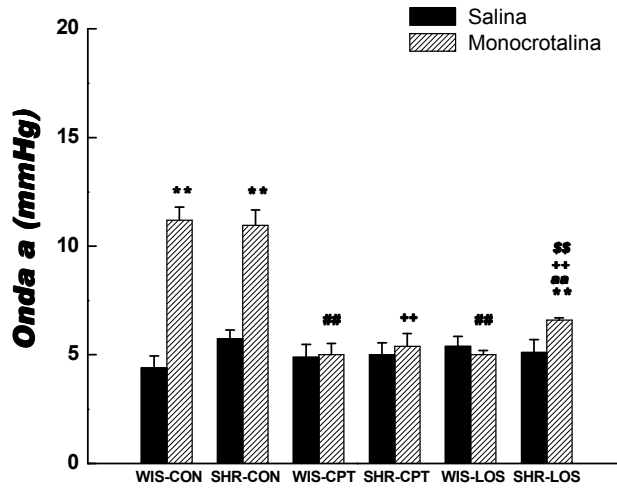
Figura 7. Valores PS Máx VD dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT, ++ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT, \$\$ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT. aa $p < 0,01$ (diferença entre o grupo WIS-CON-SAL). Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

Na figura 8 estão representados os valores de onda atriais “a”, “c” e “v”.

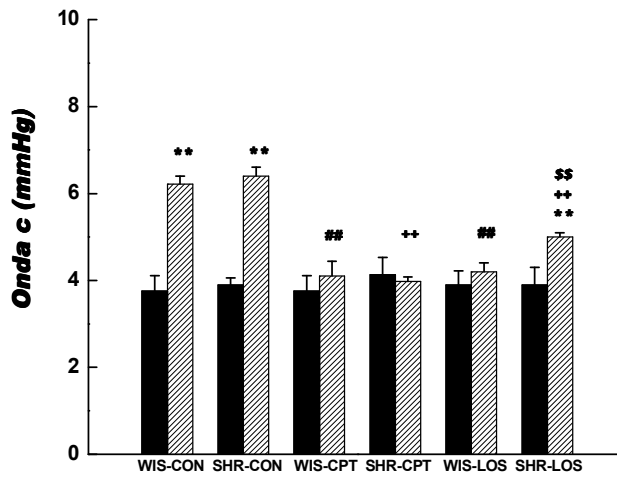
Observamos inicialmente que o tratamento com MCT nos grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT promoveu um aumento significativo nos valores destas ondas atriais em relação aos seus respectivos controles WIS-CON-SAL e SHR-CON-SAL .

Observamos também que novamente o tratamento com captopril ou losartan normalizou estes valores, contudo as ondas “a” e “c” do grupo SHR-LOS-MCT, apesar de ser observada uma atenuação, seus valores permaneceram significativamente maiores que o grupo SHR-LOS-SAL e o grupo SHR-CPT-MCT.

A



B



C

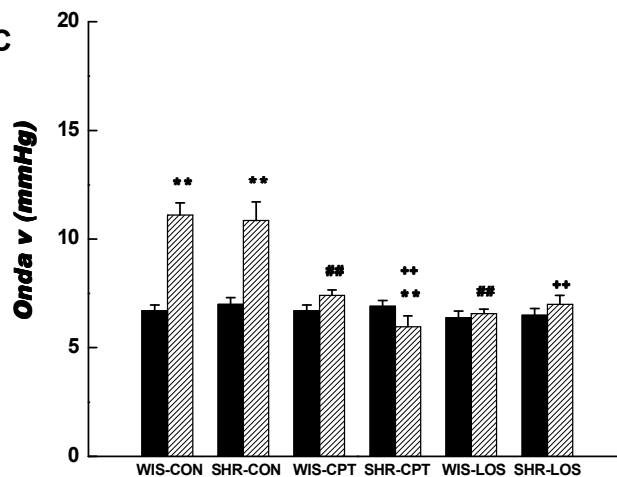


Figura 8. Valores de pressão da onda “a” (A), onda “c” (B) e onda “v” (C) do átrio direito dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT), ++ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT), \$\$\$ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT). ^{aa} $p < 0,01$ (diferença entre o grupo WIS-CON-SAL). Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *post hoc* de Tukey.

Na tabela III apresentamos os valores das pressões ventriculares de VD dos grupos estudados.

Podemos observar que o tratamento com MCT promoveu um significativo aumento de PDI, PDF, $dP/dT(+)$ e $dP/dT(-)$ nos grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT quando comparados com grupo controle WIS-CON-SAL e SHR-CON-SAL. Observamos que o tratamento com captopril e losartan normalizou estes valores.

Tabela III - Valores de PDI de VD (mmHg), PDF de VD (mmHg), dP/dT(+) de VD (mmHg/s) e dP/dT(-) de VD (mmHg/s) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

VD	WIS-CON		SHR-CON		WIS-CPT		SHR-CPT		WIS-LOS		SHR-LOS	
	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT
PDI (mmHg)	-1,5±0,1	5±0,3**	-1,6±0,06	5,3±0,4**	-1,5±0,1	-1,6±0,1 ^{##}	-1,4±0,1	-1,4±0,2 ⁺⁺	-1,3±0,1	-1,1±0,2 ^{##}	-1,2±0,2	-1,3±0,1 ⁺⁺
PDF (mmHg)	6±0,4	16±1,5**	7±1	20±1,2**	7±0,4	7±1 ^{##}	7,5±0,2	7,1±0,4 ⁺⁺	6,5±0,4	6±0,2 ^{##}	7±0,2	9±0,2 ^{***+\$\$}
dP/dT(+) (mmHg/s)	1746±67	2870±66**	1901±24	2754±88**	1749±57	1798±113 ^{##}	1800±63	1700±65 ⁺⁺	1758±86	1811±93 ^{##}	1828±100	2000±24 ^{++\$\$}
dP/dT(-) (mmHg/s)	-1811±56	-1559±54**	-1857±21	-1524±39**	-1813±56	-1920±50 ^{aa##}	-1911±65	-2033±50 ⁺⁺	-1937±31	-1817±52 ^{##}	-1785±75	-1600±34 ^{***+\$\$}

Os valores representam à média ± EPM. ** p<0,01, diferença significativa em relação aos grupos controles. ^{##} p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT. ⁺⁺ p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. ^{\$\$} p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

Na figura 9 estão representados os valores de PS Máx de VE dos grupos estudados.

Observamos inicialmente que o grupo SHR-CON-SAL (152 ± 3 mmHg) apresentou valores significativamente maiores quando comparado com o grupo WIS-CON-SAL (115 ± 6 mmHg).

Observamos também que o tratamento com MCT no grupo SHR-CON-SAL (160 ± 4 mmHg) aumentou significativamente os valores de PS Máx em relação ao seu grupo controle SHR-CON-SAL (152 ± 3 mmHg).

O tratamento com captopril e losartan normalizou os valores de PS Máx de VE dos grupos SHR-CPT-SAL (120 ± 5 mmHg) e SHR-LOS-SAL (122 ± 6 mmHg), porém, não alterou significativamente os valores destes grupos quando tratados com MCT (SHR-CPT-MCT= 119 ± 6 mmHg e SHR-LOS-MCT= 123 ± 6 mmHg).

Estes tratamentos também não alteraram os valores dos grupos Wistar, exceto no grupo WIS-CPT-MCT (113 ± 5 mmHg) em relação ao seu determinado grupo controle WIS-CON-MCT (119 ± 2 mmHg).

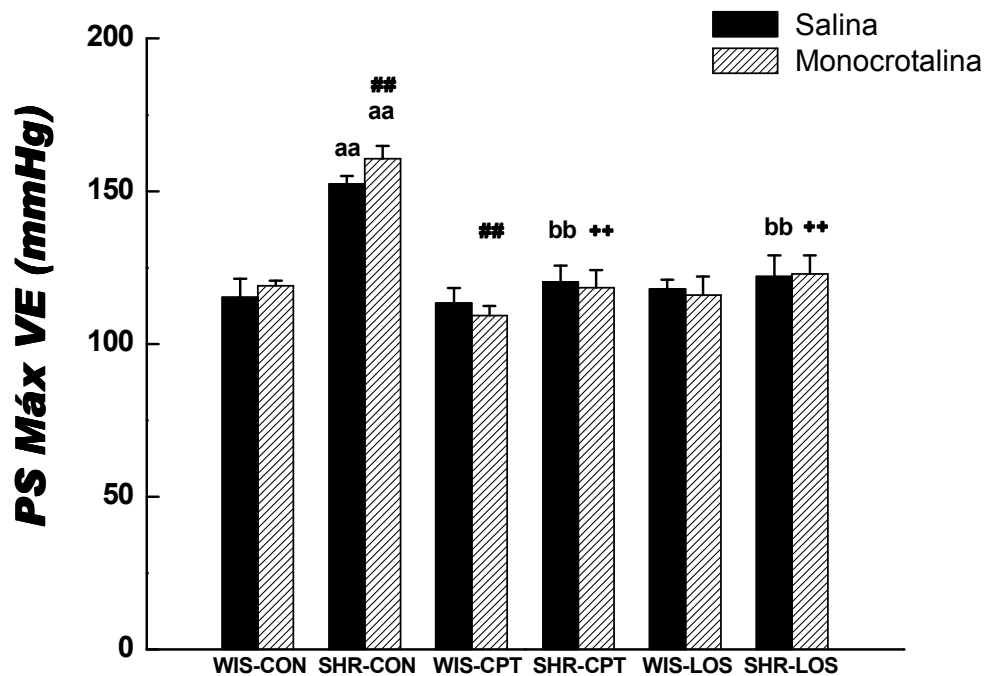


Figura 9. Valores PS Máx VE dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT, ++ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-COM-MCT, aa $p < 0,01$ (diferença entre o grupo WIS-CON-SAL), bb $p < 0,01$ (diferença entre o grupo SHR-CON-SAL). Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

Na tabela 4 apresentamos os valores de pressão ventricular do VE dos grupos estudados. Podemos observar que o tratamento com a MCT nos grupos WIS-CON-SAL e SHR-CON-SAL aumentou significativamente os valores de PDI, PDF, dP/dT (+) e dP/dT (-) em relação aos seus respectivos grupos controles WIS-CON-SAL e SHR-CON-SAL. Observamos também que o tratamento com captopril ou losartan por sua vez normalizou estes valores.

Tabela IV - Valores de PDI de VE (mmHg), PDF de VE (mmHg), dP/dT(+) de VE (mmHg/s) e dP/dT(-) de VE (mmHg/s) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

VE	WIS-CON		SHR-CON		WIS-CPT		SHR-CPT		WIS-LOS		SHR-LOS	
	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT
PDI (mmHg)	-1,26±0,05	-0,4±0,05**	-1,34±0,14	-0,17±0,07**	-1,26±0,05	-1,31±0,05 ^{##}	-1,26±0,07	-1,36±0,04 ⁺⁺	-1,38±0,1	-1,35±0,1 ^{##}	-1,24±0,01	-1,28±0,02 ^{++\$\$}
PDF (mmHg)	13±1	20±2**	15±0,7	21±1,2**	11,2±0,6	11±0,7 ^{##}	11,5±0,7	11±0,8 ⁺⁺	12±0,5	12,4±0,2 ^{##}	12±0,3	12,3±0,21 ⁺⁺
dP/dT(+) (mmHg/s)	6625±87	8542±99**	7571±60 ^{aa}	8590±99**	6625±87	6755±101 ^{##}	6828±89	6925±90 ⁺⁺	6764±116	6568±116 ^{##}	6754±110	6794±114 ⁺⁺
dP/dT(-) (mmHg/s)	-6748±164	-5957±99**	-7714±99 ^{aa}	-6886±98**	-6748±99	-6806±100 ^{##}	-6598±164	-6748±150 ⁺⁺	-6896±90	-6883±98 ^{##}	-6773±90	-6899±94 ⁺⁺

Os valores representam à média ± EPM. **p<0,01, diferença significativa em relação aos grupos controles. ^{##}p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT. ⁺⁺p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. ^{\$\$}p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

4.0-Avaliações ventilatórias

Na figura 10 estão representados os valores de FR e VC. Observamos inicialmente que o tratamento com MCT promoveu um aumento significativo dos valores de FR nos grupos WIS-CON-MCT (150 ± 8 cpm) e o grupo SHR-CON-MCT (216 ± 9 cpm) quando comparados com seus respectivos controles WIS-CON-SAL (121 ± 5 cpm) e SHR-CON-SAL (139 ± 2 cpm). É importante salientar que o grupo SHR-CON-MCT (216 ± 9 cpm) obteve valores significativamente maiores quando comparados também ao grupo WIS-CON-MCT (150 ± 8 cpm).

Podemos observar que o tratamento com captopril ou losartan normalizou estes valores, no entanto, o grupo SHR-LOS-MCT (135 ± 5 cpm) apresentou valores significativamente maiores de FR quando comparados aos grupos WIS-CON-SAL (121 ± 5 cpm) e SHR-LOS-SAL (120 ± 3 cpm).

Em relação ao V_C , resultados similares foram observados. Ressalta-se contudo que o grupo SHR-CON-SAL apresentou valores significativamente maiores em relação ao grupo WIS-CON-SAL.

Efeitos similares deste tratamento também foram observados em relação à ventilação pulmonar e a ventilação alveolar.

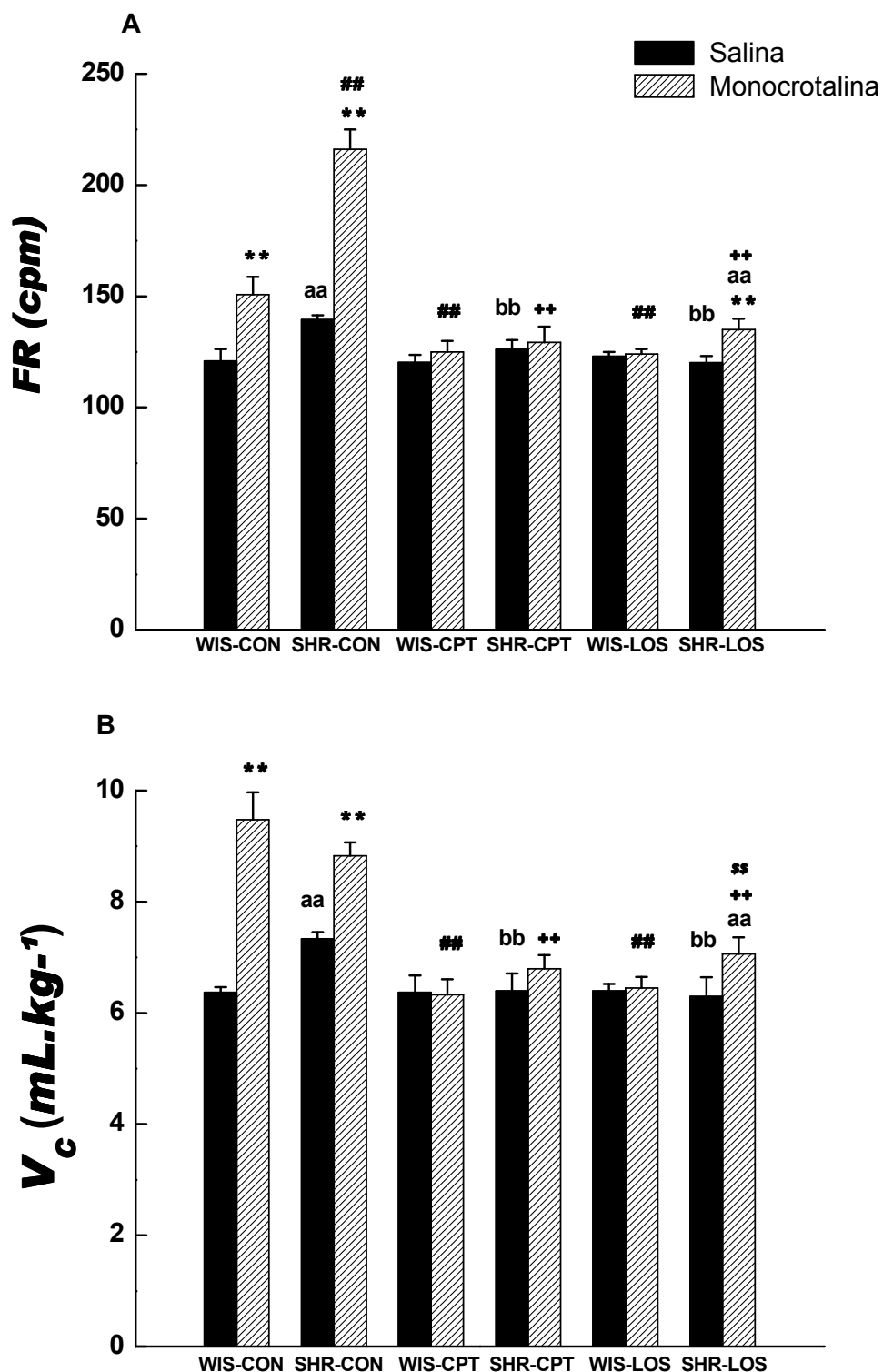


Figura 10. Valores de FR (A) e V_c (B) dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT). ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT, ++ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. ^{aa} $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo WIN-CON-SAL. ^{bb} $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. ^{\$\$} $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

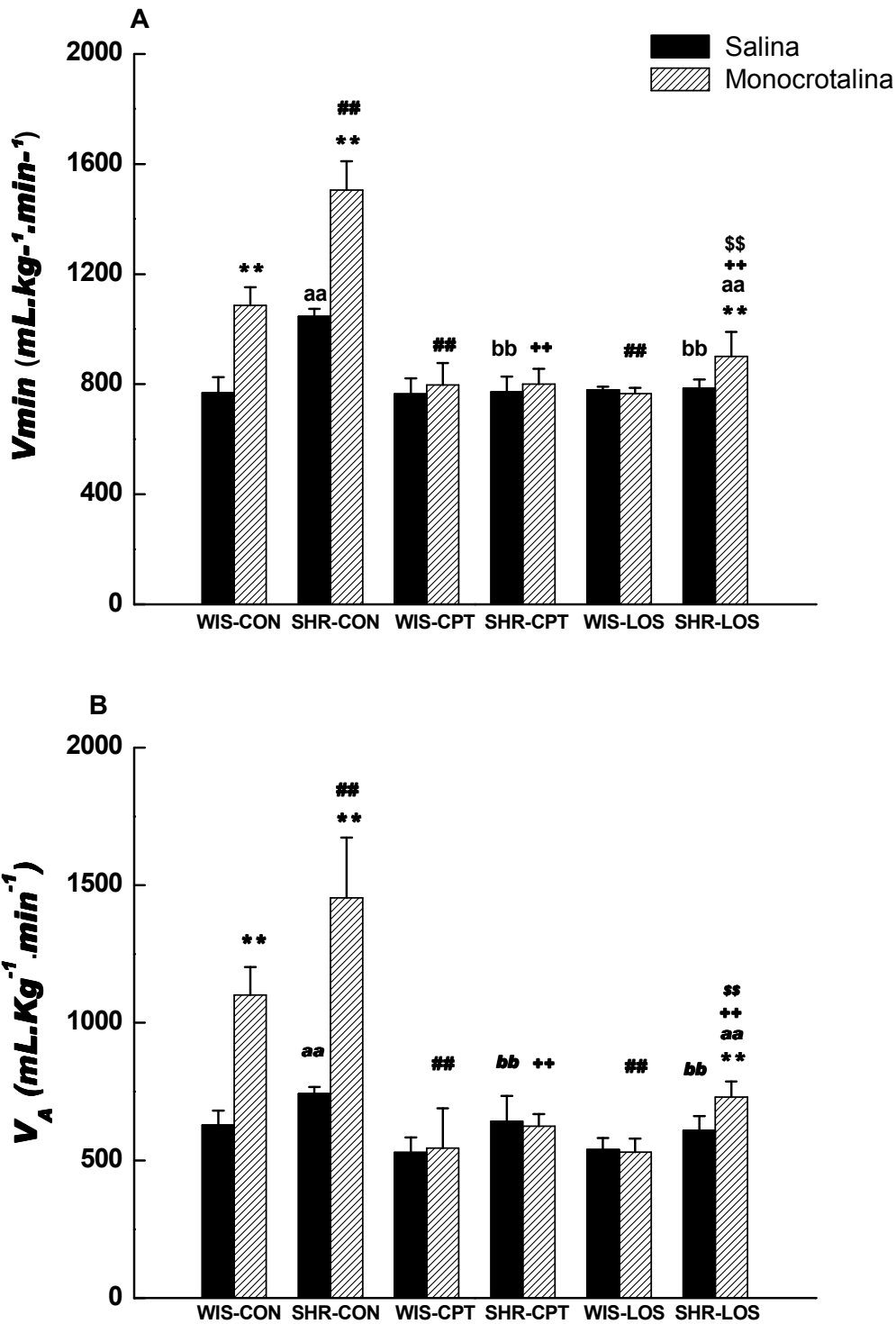


Figura 11. Valores de V_{min} (A) e V_A (B) dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. $**p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), $##p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT), $++p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT). $^{aa}p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-SAL. $^{bb}p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-SAL. $^{ss}p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

5.0 – Avaliações gasométricas

Na figura 12 estão representados os valores de PaO₂ e PaCO₂.

Podemos observar que o tratamento com MCT promoveu uma diminuição (hipóxia) significativa de PaO₂ nos animais WIS-CON-MCT (90±2 mmHg) e SHR-CON-MCT (82±2 mmHg) quando comparados com seus respectivos controles WIS-CON-SAL (97±1 mmHg) e SHR-CON-SAL (96±1 mmHg).

Após o tratamento com captopril, observamos que os valores de PaO₂ dos grupos WIS-CPT-MCT (97±1 mmHg) e SHR-CPT-MCT (97±2 mmHg) se normalizaram.

O tratamento com losartan por sua vez normalizou os valores de PaO₂ no grupo WIS-LOS-MCT (95±1 mmHg), mas não no grupo SHR-LOS-MCT (90±3 mmHg), o qual mostrou valores significativamente menores de PaO₂ quando comparados com os grupos WIS-CON-SAL (97±1 mmHg) e SHR-LOS-SAL (96±1 mmHg).

Em relação a PaCO₂ (figura 8B), observamos inicialmente que o tratamento com MCT promoveu um aumento significativo de PaCO₂ (hipercapnia) nos grupos WIS-CON-MCT (43±1 mmHg) e SHR-CON-MCT (49±1 mmHg) em relação aos seus respectivos grupos controles WIS-CON-SAL (36±1 mmHg) e SHR-CON-SAL (37±1 mmHg).

Após o tratamento com captopril, os valores de PaCO₂ foram normalizados nos grupos WIS-CPT-MCT (37±1 mmHg) e SHR-CPT-MCT (38±2 mmHg).

O tratamento com losartan por sua vez normalizou os valores no grupo WIS-LOS-MCT (37±2 mmHg), mas não no grupo SHR-LOS-MCT (42±1 mmHg), o qual permaneceu significativamente elevado em relação ao grupo WIS-CON-SAL (36±1 mmHg), SHR-CPT-MCT (38±2 mmHg) e SHR-LOS-SAL (36±1 mmHg).

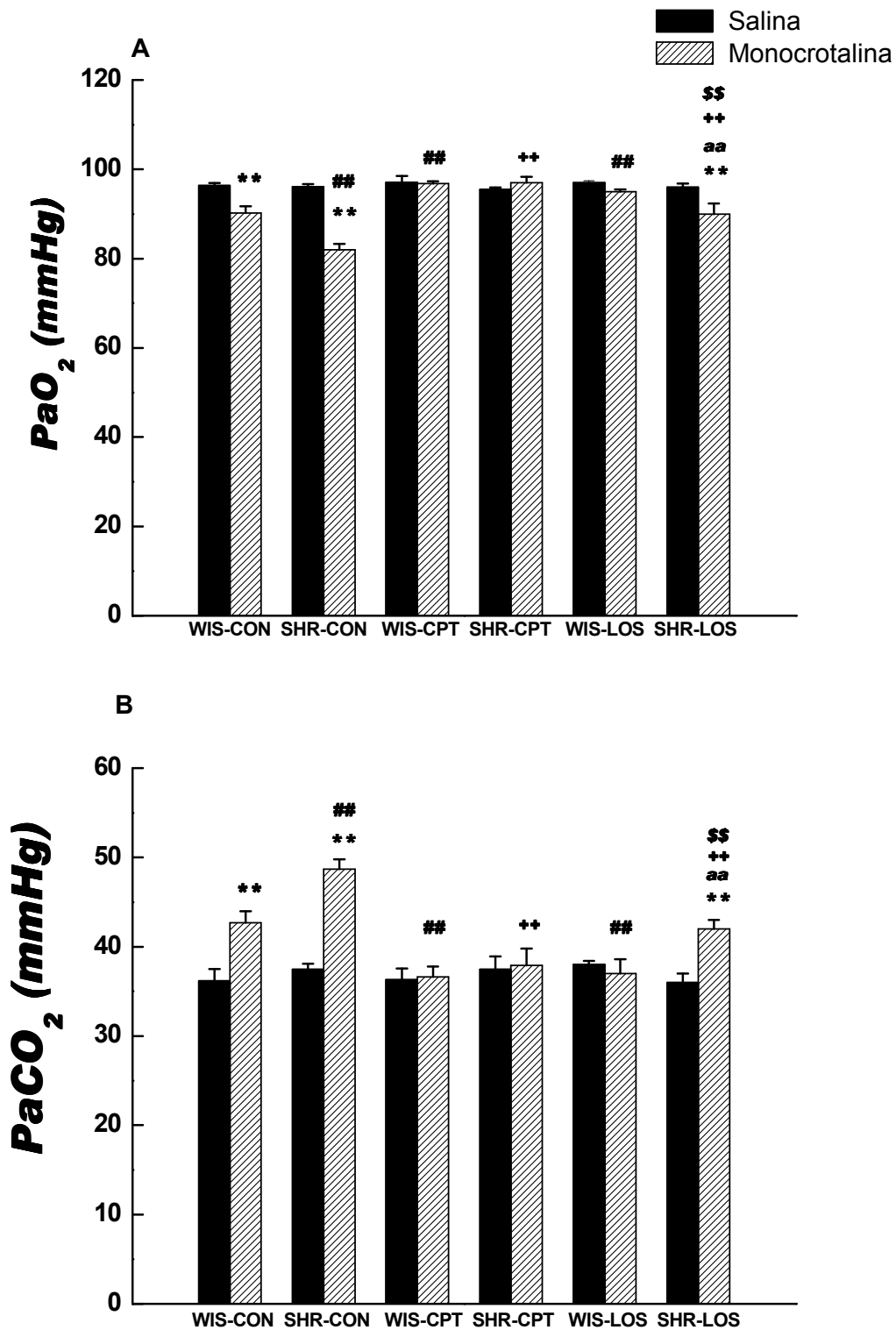


Figura 12. Valores de PaO₂ (A) e PaCO₂ (B) dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT). **p<0,01 (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ###p<0,01 (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT), ++p<0,01 (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT). ^{aa}p<0,01 diferença significativa em relação ao grupo WIN-CON-SAL. ^{\$\$}p<0,01 (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT). Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

Na figura 13 estão representados os valores de Saturação da hemoglobina, HCO_3^- e pH.

Observamos na figura 13 A que o tratamento com MCT nos grupos WIS-CON-MCT (94 ± 1 % Hb) e SHR-CON-MCT (93 ± 1 % Hb) causou diminuição significativa dos valores de saturação quando comparados com seus respectivos controles WIS-CON-SAL (98 ± 1 % Hb) e SHR-CON-SAL (98 ± 1 % Hb). observamos inicialmente que o tratamento com captopril ou losartan normalizou os valores de saturação.

O grupo SHR-LOS-MCT apresentou diminuição significativa de saturação quando comparado ao grupo WIS-CON-SAL (98 ± 1 % Hb), o grupo SHR-LOS-SAL (98 ± 1 % Hb) e o grupo SHR-CPT-MCT (98 ± 2 % Hb).

Na figura 13 B estão representados os valores de HCO_3^- .

Podemos observar que o tratamento com MCT aumentou significativamente os valores de HCO_3^- nos grupos WIS-CON-MCT (46 ± 1 mmol/L) e SHR-CON-MCT (46 ± 1 mmol/L) quando comparados com seus respectivos grupos WIS-CON-SAL ($35 \pm 0,3$ mmol/L) e SHR-CON-SAL ($36 \pm 0,3$ mmol/L).

O tratamento com captopril ou losartan normalizou esta variável nos grupos estudados.

Na figura 13 C, estão representados os valores de pH.

Observamos inicialmente que o tratamento com MCT diminuiu os valores de pH nos grupos WIS-CON-MCT ($7,35 \pm 0,0025$) e SHR-CON-MCT ($7,35 \pm 0,001$) quando do comparado com seus respectivos controles WIS-CON-SAL ($7,4 \pm 0,005$) e SHR-CON-SAL ($7,4 \pm 0,01$). Após o tratamento com captopril ou losartan os animais tiveram seus valores normalizados, no entanto, os animais do grupo SHR-LOS-MCT apresentou diminuição significativa de pH ($7,39 \pm 0,003$), quando comparado com seus respectivos controle SHR-LOS-SAL ($7,42 \pm 0,003$), o grupo SHR-CPT-MCT ($7,41 \pm 0,012$) e o grupo WIS-CON-SAL ($7,4 \pm 0,005$).

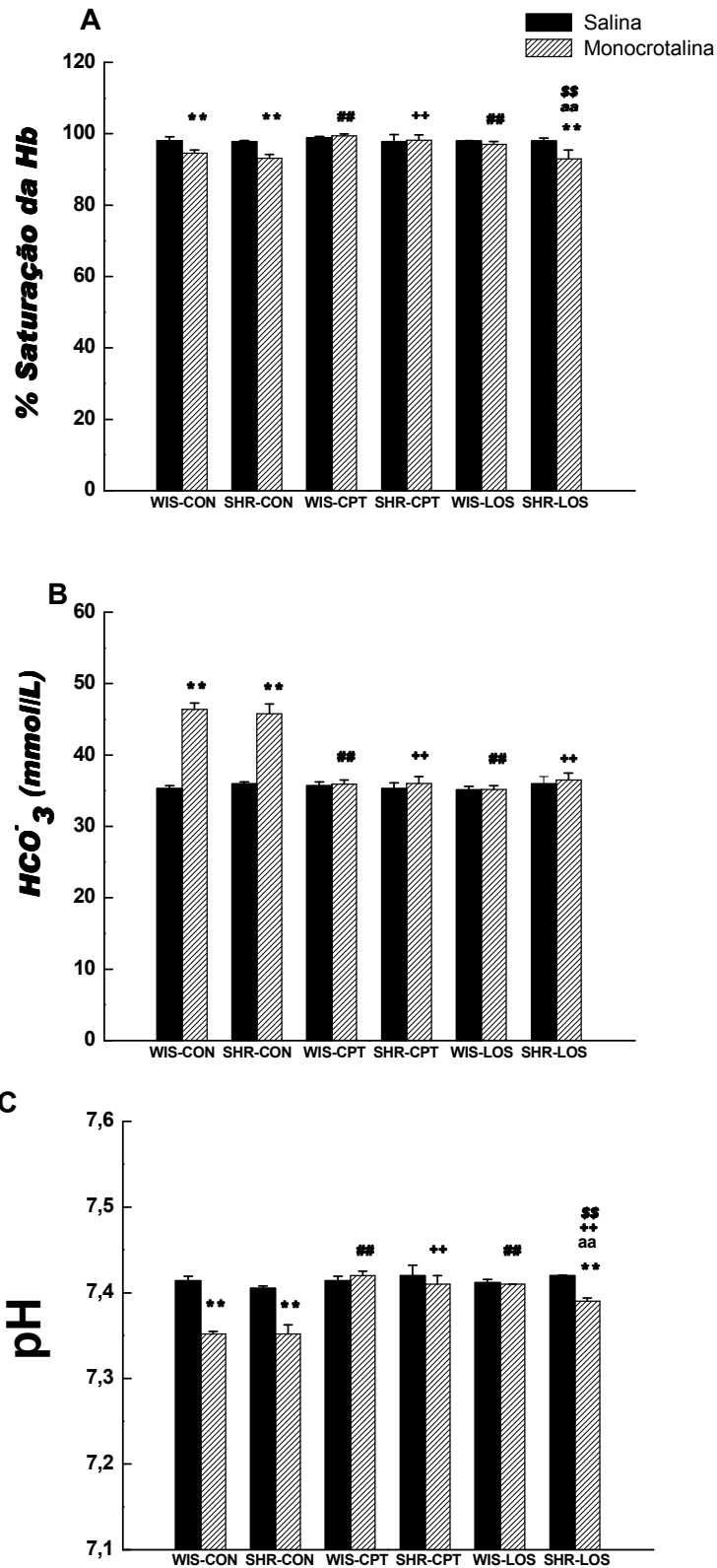


Figura 13. Valores de porcentagem de saturação da hemoglobina (A), HCO_3^- (B) e pH (C) dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT, ++ $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. aa $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo WIN-CON-SAL. \$s $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *post hoc* de Tukey.

6.0 – Bloqueios autonômicos

Na figura 14 apresentamos os valores de FC obtidos antes e após os bloqueios autonômicos com atenolol e metil-atropina, representando uma estimativa da atividade simpática e parassimpática destes animais.

Podemos observar inicialmente (figura 14 A) que os animais do grupo WIS-CON-SAL apresentam valores normais de tônus simpático e tônus parassimpático, ou seja, uma predominância do tônus parassimpático em relação ao tônus simpático. O grupo SHR-CON-SAL apresentou por sua vez, o tônus simpático significativamente elevado e também uma redução significativa do tônus parassimpático, quando comparado ao grupo WIS-CON-SAL.

Após a administração de MCT, tantos os animais do grupo wistar e SHR tiveram inversões significativas no controle autonômico cardíaco, ou seja, aumento do tônus simpático e diminuição do tônus parassimpático.

O tratamento com captopril (figura 14 B) reverteu às alterações causadas pela MCT, ou seja, normalizou o tônus simpático e parassimpático cardíaco nos animais Wistar e SHR tratados com captopril e MCT.

O tratamento com losartan por sua vez (figura 14 C) normalizou a atividade do componente autonômico, ou seja, simpático e parassimpático dos animais wistar. No entanto, os animais do grupo SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT apresentaram valores significativamente aumentados de tônus simpático e diminuição de tônus parassimpático em relação ao grupo SHR-CPT-MCT e do grupo WIS-CON-SAL.

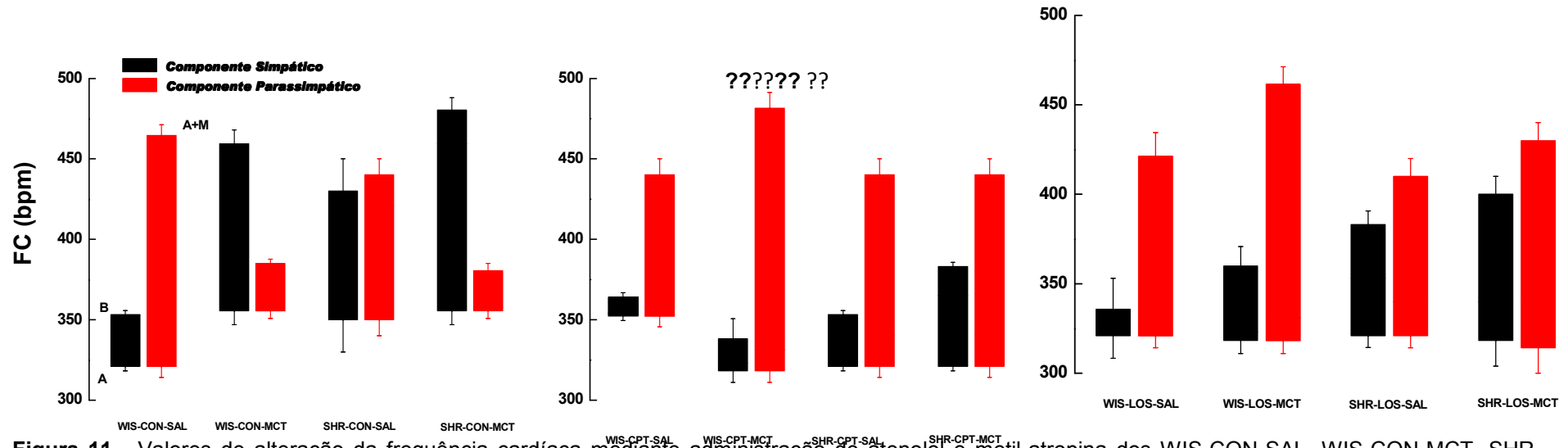


Figura 11 - Valores de alteração da frequência cardíaca mediante administração de atenolol e metil-atropina dos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. B=basal; A=atenolol; A+M=atenolol + metil-Atropina.

Tabela V- Valores de FC após a administração de atenolol e atenolol + metil-atropina nos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT.

Os valores representam à média \pm EPM. ** $p < 0,01$, diferença significativa em relação aos grupos controles. ### $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao

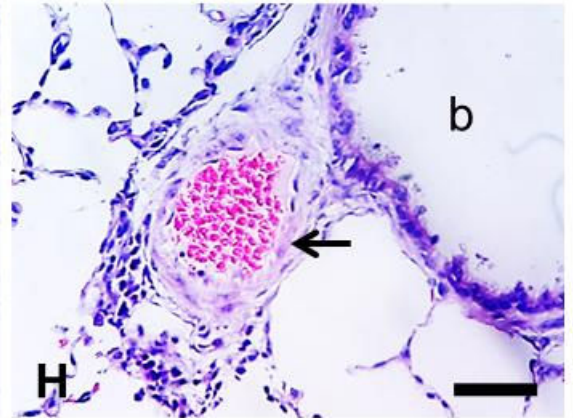
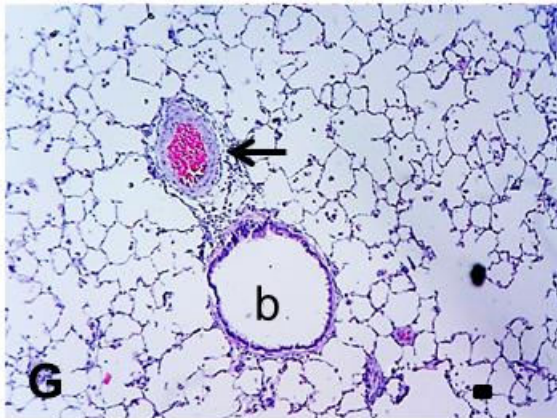
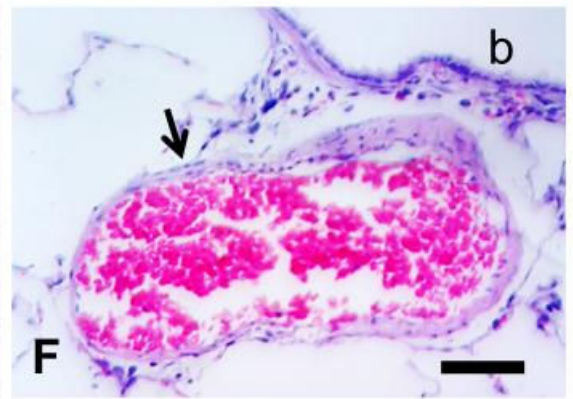
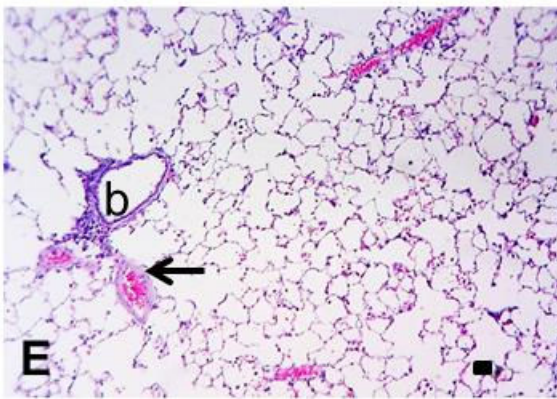
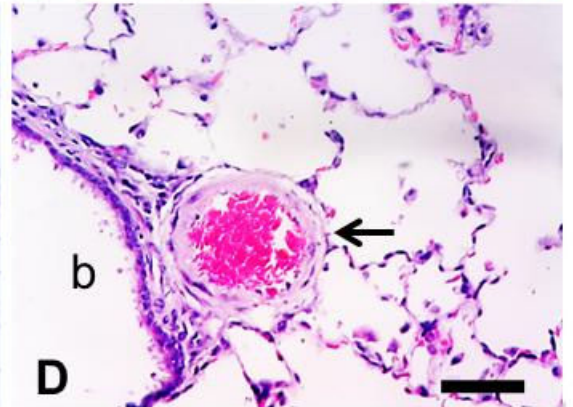
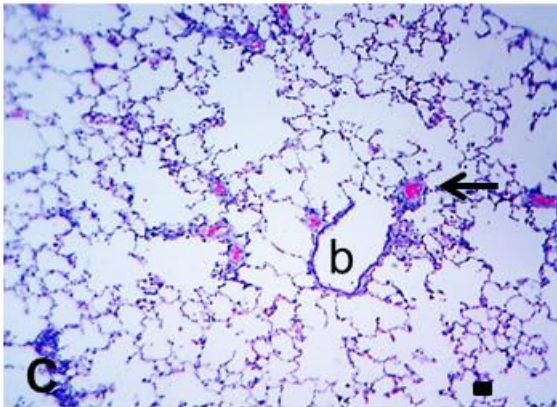
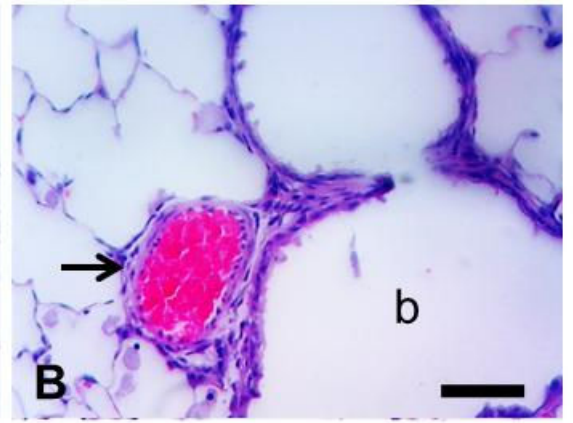
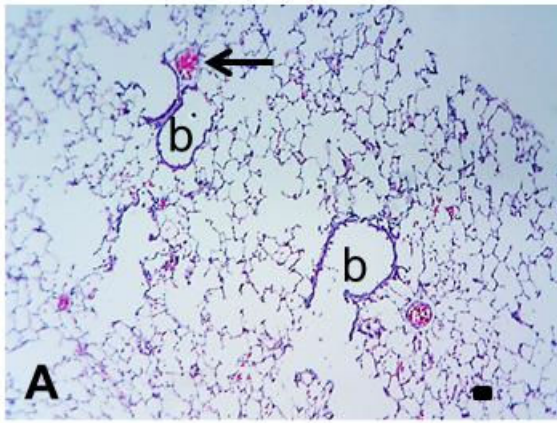
Δ FC	WIS-CON		SHR-CON		WIS-CPT		SHR-CPT		WIS-LOS		SHR-LOS	
	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT	SAL	MCT
Após Atenolol	-30 \pm 3	-100 \pm 4**	-98 \pm 14 ^{aa}	-120 \pm 7**	-20 \pm 4###	-24 \pm 11###	-38 \pm 3 ^{bb++}	-60 \pm 4 ^{bb++}	-24 \pm 12###	-46 \pm 12###	-62 \pm 8 ^{aa++}	-88 \pm 4 ^{aa++\$\$}
Após Atenolol+ metil atropina	150 \pm 9	30 \pm 3**	100 \pm 9 ^{aa}	17 \pm 4**	100 \pm 13###	160 \pm 8###	120 \pm 10 ^{bb++}	118 \pm 9 ^{bb++}	104 \pm 11###	154 \pm 7###	105 \pm 8 ^{aa++}	110 \pm 9 ^{aa++\$\$}

grupo WIS-CON-MCT. ++ $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-MCT. \$\$ $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo SHR-CPT-MCT. ^{aa} $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-SAL. ^{bb} $p < 0,01$ diferença significativa em relação ao grupo SHR-CON-SAL Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

7.0 – Avaliações histológicas

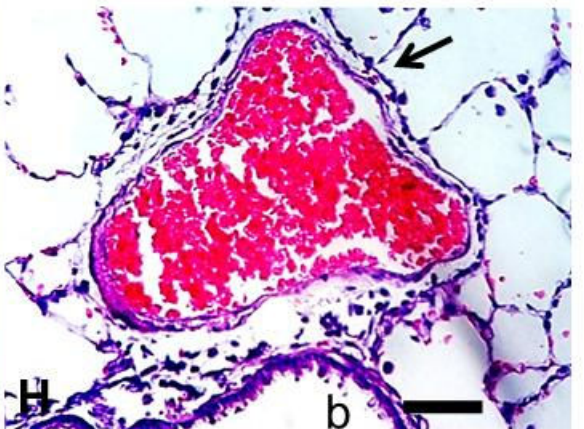
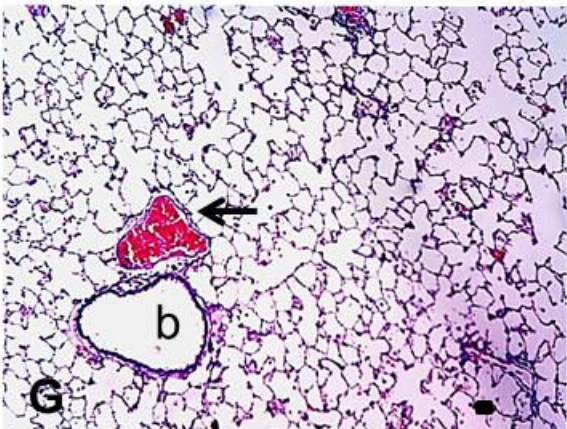
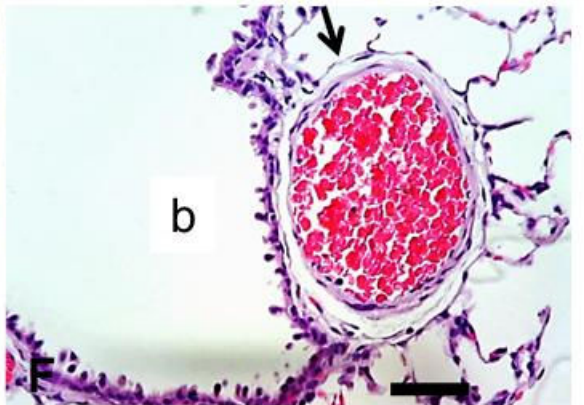
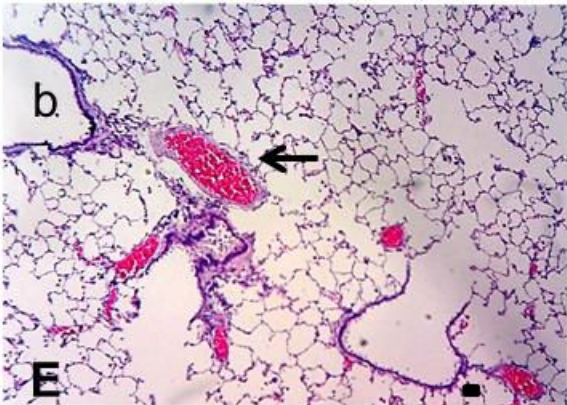
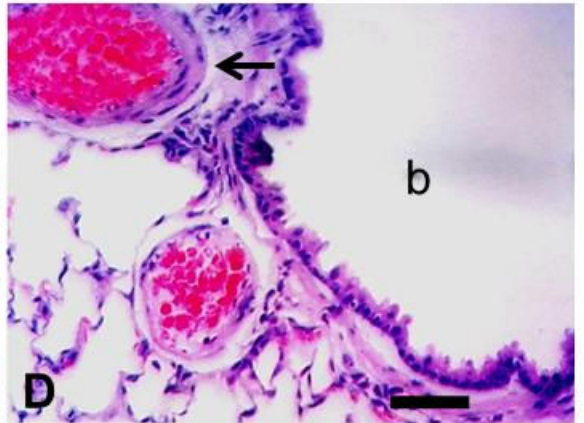
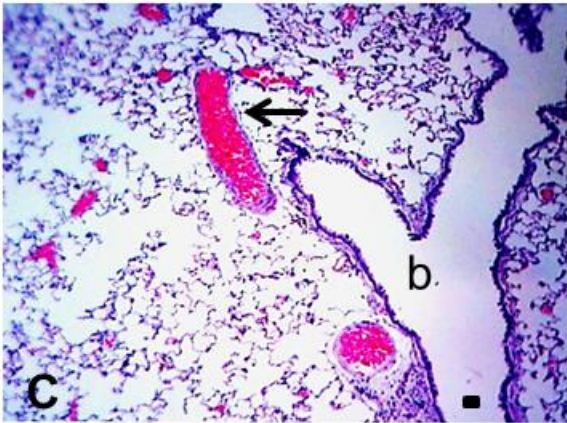
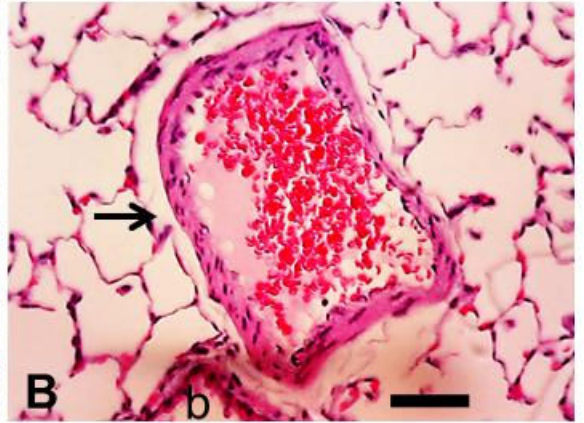
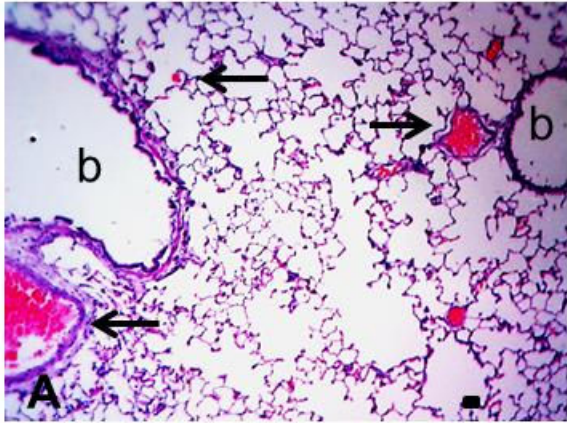
Figura 15. Hipertrofia da camada média dos ramos musculares da artéria pulmonar em ratos wistar (C e D) e ratos SHR (G e H) tratados com dose única (60 mg/kg), subcutânea, de monocrotalina e eutanasiados três semanas após o tratamento. As figuras A e B e E e F mostram ?? pulmões de ratos que receberam injeção de salina (A e B, ratos wistar e E e F ratos SHR). As setas indicam os ramos musculares ao lado de bronquíolos (b). As barras indicam 50 um. (Coloração: hematoxilina e eosina).

??



??

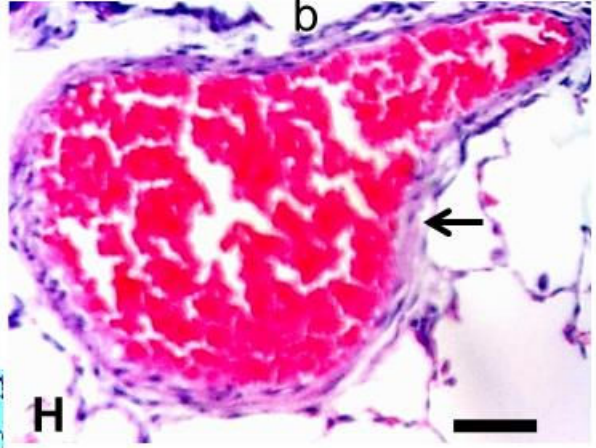
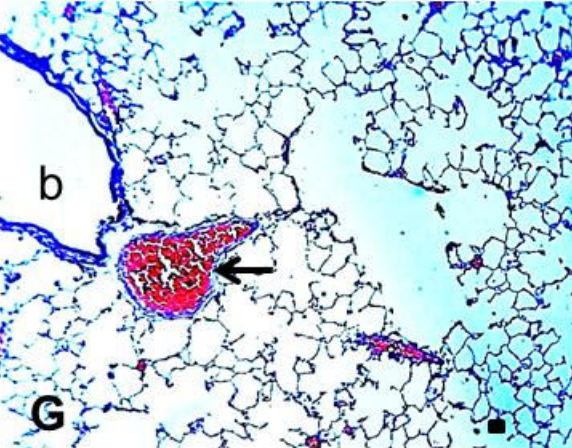
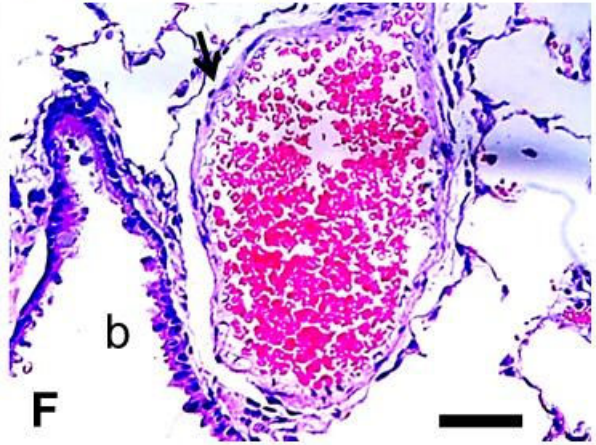
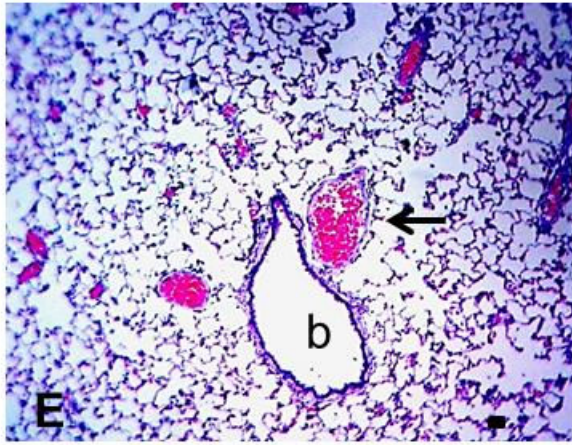
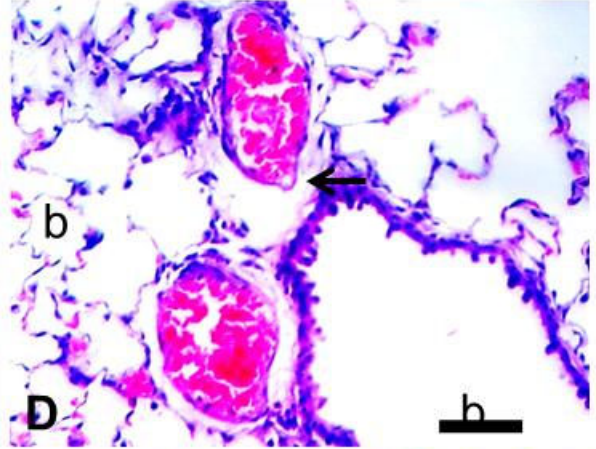
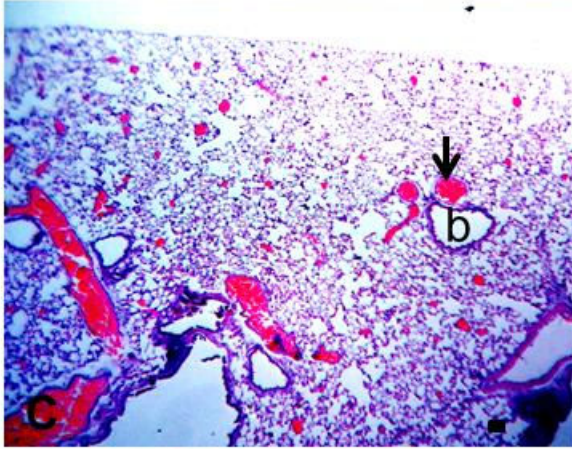
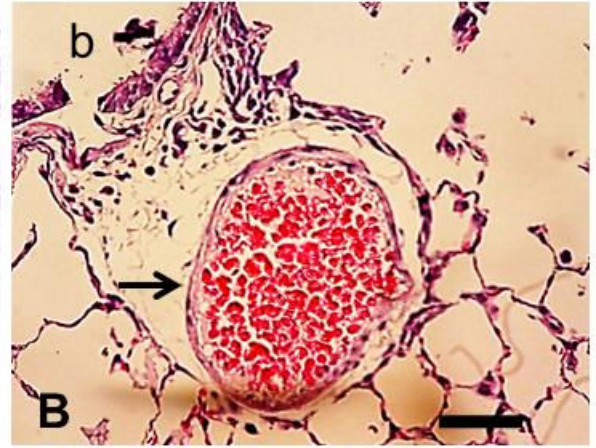
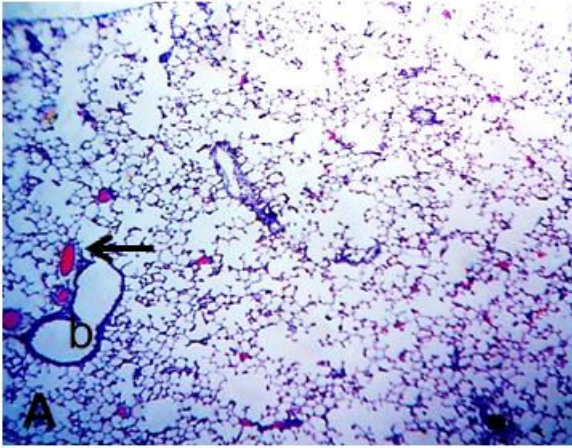
Figura 16. Efeito do tratamento com captopril em ratos wistar e SHR com hipertensão pulmonar induzida pela injeção de monocrotalina (60 mg/kg, via subcutânea). Observar a dilatação dos vasos pulmonares inclusive dos ramos terminais da artéria pulmonar (setas), nos animais controle tratados só com captopril (A e B, WIS-CPT-SAL ;F e G SHR-CPT-SAL). Nos animais wistar ou SHR, tratados com monocrotalina e depois com captopril, observar redução da hipertrofia da camada média dos ramos musculares da artéria pulmonar (setas) junto aos bronquíolos (b), as quais apresentam espessura da parede semelhante às do grupo controle captopril (C e D, WIS-CPT-MCT; G e H, SHR-CPT-MCT). As barras indicam 50 um. Coloração: hematoxilina e eosina



??

Figura 17. Efeito do tratamento com losartan em ratos wistar e SHR com hipertensão pulmonar induzida pela injeção de monocrotalina (60 mg/kg, via subcutânea). Observar a dilatação dos vasos pulmonares inclusive dos ramos terminais da artéria pulmonar (setas), nos animais controle tratados só com losartan (A e B, WIS-LOS-SAL ;F e G SHR-LOS-SAL). Nos animais wistar ou SHR, tratados com monocrotalina e depois com losartan, observar redução da hipertrofia da camada média dos ramos musculares da artéria pulmonar (setas) junto a bronquíolos (b), as quais apresentam espessura da parede semelhante as do grupo controle losartan (C e D, WIS-LOS-MCT; G e H, SHR-LOS-MCT). As barras indicam 50 um. Coloração: hematoxilina e eosina.

??

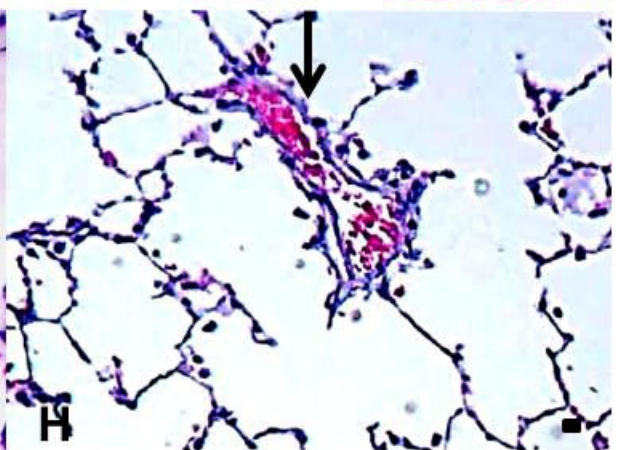
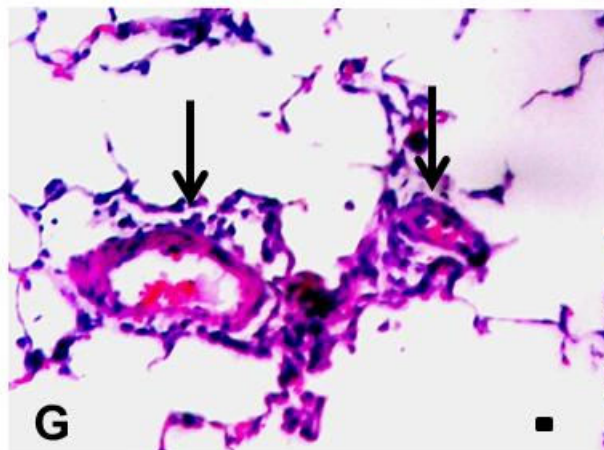
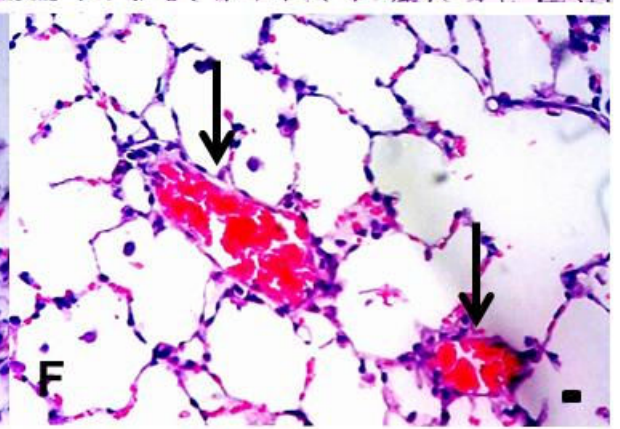
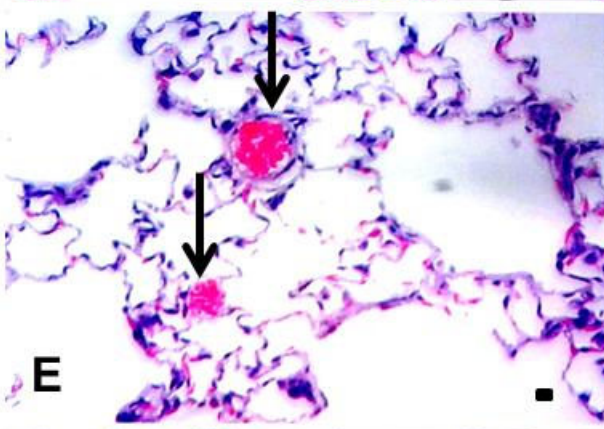
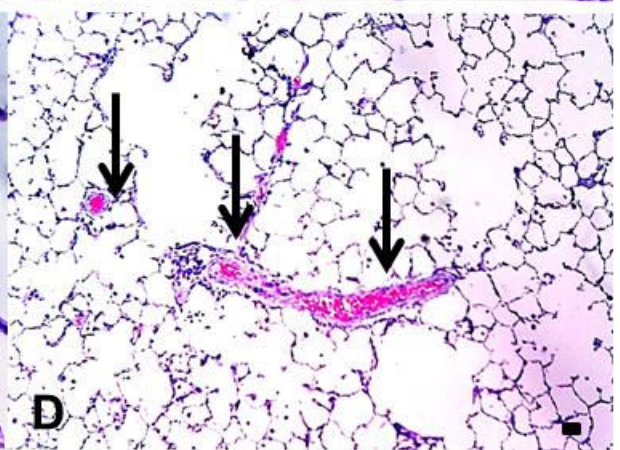
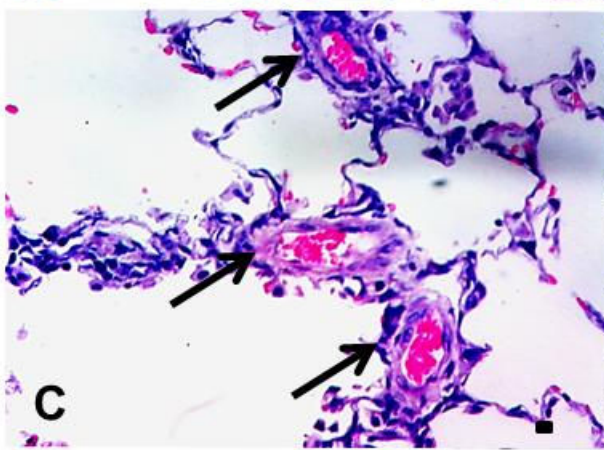
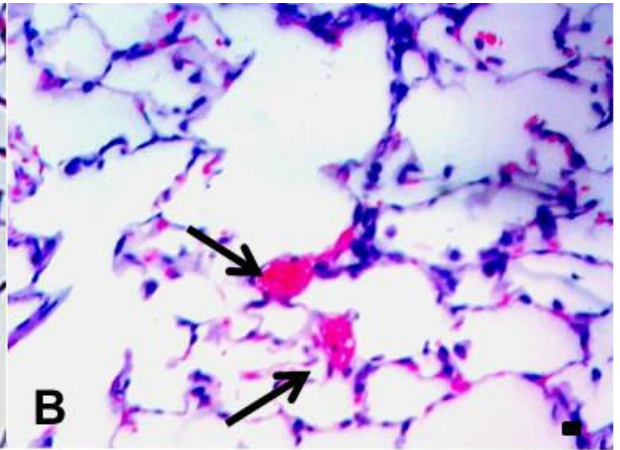
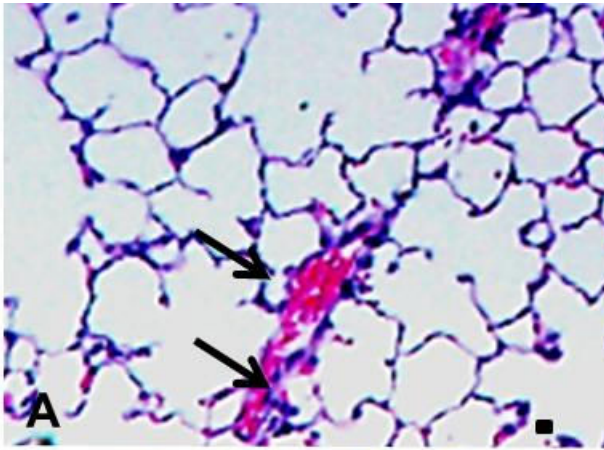


??

??

??

Figura 18. Detalhe dos ramos terminais da artéria pulmonar em ratos Wistar e SHR que receberam monocrotalina (60mg/kg por via subcutânea) ou salina (grupos controle) e tratados três semanas após, durante duas semanas com captopril ou losartan administrados na água de beber. Observar os vasos dilatados, com parede muito fina, nos animais controle que receberam somente salina (A: ratos Wistar e B: ratos SHR). Nos animais que receberam monocrotalina e não foram tratados com captopril ou losartan, os ramos terminais da artéria pulmonar apresentam desenvolvimento de camada muscular evidente (WIS-CON-MCT e D: SHR-CON-MCT). Nos animais que receberam a monocrotalina e foram tratados ou com captopril ou com losartan há uma evidente redução na muscularização dos ramos terminais da artéria pulmonar. (E: WIS-CPT-MCT; F: SHR-CPT-MCT; G: WIS-LOS-MCT e H: SHR-LOS-MCT). As barras indicam 50 um. Coloração: hematoxilina e eosina.



Na figura 19 estão representados os valores histológicos de relação entre a parede e o diâmetro externo (%) (A), relação entre DI e DE (%) (B) e a relação parede lúmen (C).

Podemos observar inicialmente que a relação da parede sobre o DE em porcentagem (19 A) dos animais tratados com MCT, ou seja, WIS-CON-MCT (31 ± 5) e SHR-CON-MCT (44 ± 2) quando comparados com seus respectivos controles WIS-CON-SAL (11 ± 2) e SHR-CON-SAL (10 ± 2).

O tratamento com captopril normalizou este parâmetro tanto em ratos wistar e ratos SHR.

Com relação ao tratamento com losartan, observamos inicialmente que os parâmetros também foram normalizados, no entanto, o grupo SHR-LOS-MCT (12 ± 2) mostrou valores significativamente maiores do que o grupo SHR-CPT-MCT (10 ± 1).

Na figura 19 B estão representados os valores de relação entre o DI sobre o DE em porcentagem.

Inicialmente podemos observar que os animais tratados com MCT apresentaram diminuição da relação, ou seja, o grupo WIS-CON-MCT (37 ± 11) e SHR-CON-MCT (11 ± 4) quando comparados com seus respectivos controles WIS-CON-SAL (78 ± 4) e SHR-CON-SAL (80 ± 5).

Após o tratamento com captopril ou losartan, os valores foram plenamente normalizados. É importante ressaltar que o grupo SHR-LOS-MCT (75 ± 5) mostrou valores significativamente maiores em relação ao grupo SHR-CPT-MCT (81 ± 3).

Na figura 19 C estão representados os valores de relação da parede da arteríola sobre o lúmen da mesma.

Observamos que o tratamento com MCT aumentou esta relação no grupo WIS-CON-MCT ($2,1\pm 0,9$) e no grupo SHR-CON-MCT (10 ± 2).

Após o uso do captopril ou losartan, todos os grupos estudados apresentaram normalização de seus parâmetros.

Foi observado que o grupo SHR-LOS-MCT ($0,4 \pm 0,1$) apresentou valores significativamente maiores de relação da parede arteriolar em relação ao lúmen quando comparado ao grupo SHR-CPT-MCT ($0,2 \pm 0,07$).

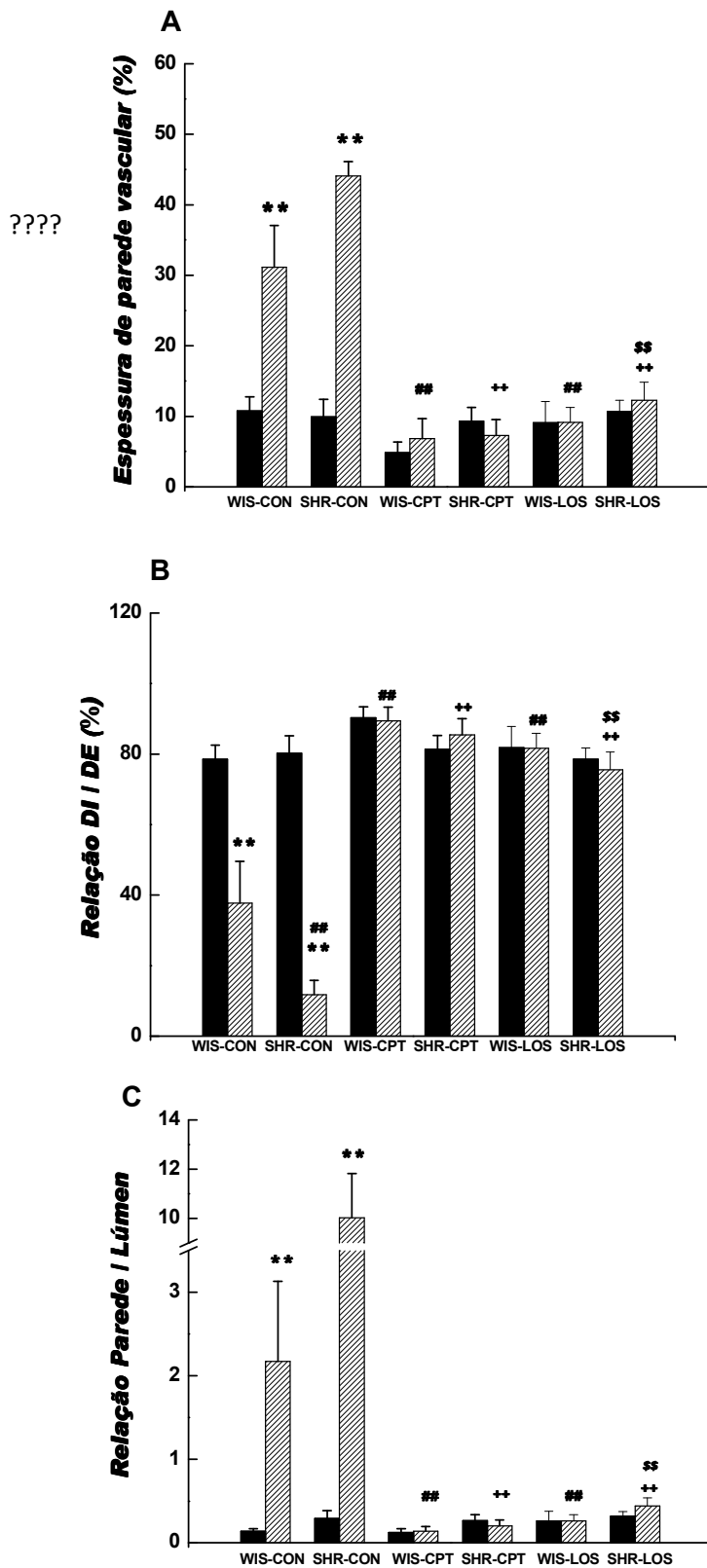


Figura 19. Valores de espessura de parede muscular em porcentagem (A), relaçaõ do diâmetro interno sobre o diâmetro externo em porcentagem (B) e relaçaõ parede sobre o lúmen (C) dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relaçaõ ao grupo WIS-CON-MCT, ++ $p < 0,01$ (diferença significativa em relaçaõ ao grupo SHR-CON-MCT. \$\$ $p < 0,01$ (diferença significativa em relaçaõ ao grupo SHR-CPT-MCT. Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

Na figura 20 encontram-se representado a quantidade de arteríolas observáveis por mm^2 .

Observamos que todos os grupos submetidos ao tratamento com MCT apresentaram um aumento significativo das arteríolas, e tal aumento não foi revertido com o uso de captopril ou losartan.

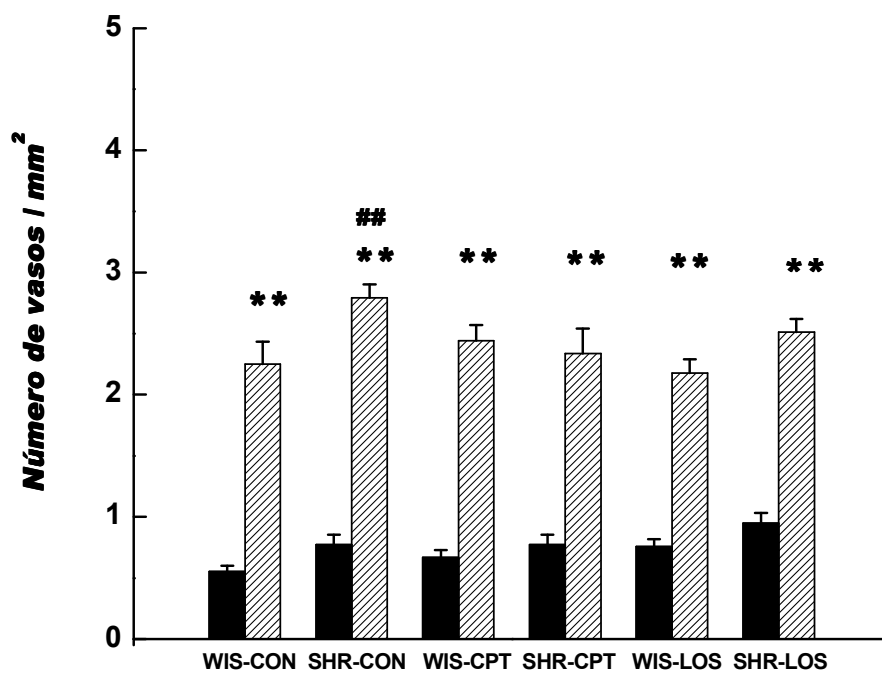


Figura 20. Quantidade de arteríolas observáveis por mm^2 dos animais dos grupos WIS-CON-SAL, WIS-CON-MCT, SHR-CON-SAL, SHR-CON-MCT, WIS-CPT-SAL, WIS-CPT-MCT, SHR-CPT-SAL, SHR-CPT-MCT, WIS-LOS-SAL, WIS-LOS-MCT, SHR-LOS-SAL e SHR-LOS-MCT. ** $p < 0,01$ (diferença significativa de cada grupo com seu controle), ## $p < 0,01$ (diferença significativa em relação ao grupo WIS-CON-MCT). Estatística: Análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) de duas vias com *pos hoc* de Tukey.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o tratamento com captopril e losartan normalizou as alterações cardiovasculares, respiratórias e autonômicas caracterizadas por hipertensão arterial, taquicardia, elevação do Índice Pulmonar, elevação das pressões de átrio (ondas "a", "c" e "v") e ventrículo (PSmáx, PDI e PDF) direito, elevação da FR e V_c , hipóxia, hipercapnia e disautonomia (hiperatividade simpática e atenuação da atividade parassimpática) em ratos *Wistar* e SHR submetidos a HAP pela MCT. Observamos também que alguns parâmetros tiveram uma melhora mais expressiva com o tratamento com captopril do que o tratamento com losartan. Ou seja, observamos que os grupos *Wistar* e SHR induzidos a HAP e tratados com captopril (WIS-CPT-MCT e SHR-CPT-MCT) apresentaram uma normalização de todos os parâmetros mensurados quando comparados ao grupo WIN-CON-SAL. O tratamento com losartan no grupo *Wistar* (WIS-LOS-MCT) também teve seus parâmetros normalizados em relação ao grupo WIS-CON-SAL, porém o mesmo não ocorreu no grupo SHR-LOS-MCT em vários dos parâmetros estudados.

Os achados obtidos na análise histológica também chamaram a atenção para as diferenças de respostas observadas entre os tratamentos com captopril e losartan. Ou seja, embora todos os parâmetros histológicos tenham sido normalizados com estes tratamentos quando comparados ao grupo WIS-CON-SAL, diferenças ainda foram observadas entre os grupos SHR-CPT-MCT e SHR-LOS-MCT quando comparados entre si, no que se refere aos parâmetros: espessura de parede, lúmen e relação parede/lúmen.

1.0 – Avaliações hemodinâmicas

O modelo de HAS proposto para o presente estudo foi o de animais SHR. Tal modelo é considerado o de primeira escolha para o estudo desta doença, pois o mesmo apresenta elevações de PA sem etiologia específica, aumento da resistência vascular periférica (RVP) sem expansão de volemia e responde de forma similar ao tratamento com drogas anti-hipertensivas, podendo ser considerado um modelo análogo a HAS humana (Okamoto e Aoki, 1963).

Estudos prévios, tais como o de Okunishi et al (1991), sugeriram que a participação do SRA possui grande importância para o desenvolvimento dos altos níveis pressóricos observado nestes animais, uma vez que o aumento da RVP parece ter um papel primário tanto no desenvolvimento, como na manutenção da HAS em ratos SHR. Contudo, este aumento da RVP pode ser atribuído a diversos fatores, tais como: aumento dos níveis de renina e angiotensinogênio plasmáticos, (Ruiz et al., 1990; Henrich et al., 1991), aumento da reatividade vascular a norepinefrina (Ekas et al, 1981), diminuição da reatividade vascular a acetilcolina (Teschfarian et al, 1995), aumento da atividade autonômica simpática e redução do tônus parassimpático (Salgado et al., 2006), aumento da afinidade da AII ao receptor AT_1 no núcleo do trato solitário (NTS), cujo núcleo possui grande importância no controle dos mecanismos reflexos cardiovasculares (Plunkett et al., 1985), além de processo inflamatório no NTS de ratos SHR com potente adesão leucocitária e plaquetária, o que poderia contribuir para a hipertensão neurogênica (Waki et al., 2008; Paton and Waki, 2008).

As alterações hemodinâmicas observadas no presente estudo em ratos SHR foram caracterizadas por aumento dos níveis pressóricos de PAM, PAS, PAD, PP e PSmáx do VE, além de um aumento de FC. Estes achados são típicos da HAS e estão de acordo com estudos disponíveis na literatura (Dickout et al, 1998, Cingolani et al, 2003).

Por outro lado, o tratamento com MCT no presente estudo induziu a HAP tanto em animais *Wistar*, quanto em SHR.² Com a instalação da HAP, observamos que os grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT apresentaram significativas alterações hemodinâmicas, caracterizadas por incrementos nas variáveis: PAM, PAS, PAD, PP³, LPA e FC. Ou seja, os ratos SHR, que já apresentavam HAS, com o tratamento com MCT, apresentaram níveis mais elevados de HAS, além da HAP. Não existem estudos disponíveis na literatura com ratos SHR submetidos a HAP pela MCT.

O mecanismo de desenvolvimento de HAP através da MCT já foi anteriormente estudado (Mingatto et al., 2008; Daicho et al., 2009; Ludke et al., 2010). A MCT é um alcalóide obtido das sementes da *Crotalaria spectabilis*, cujo exato mecanismo celular e molecular ainda é desconhecido. Sabe-se que a MCT requer metabolização hepática e, através da bioativação do citocromo p-450, é transformada em dihidro-monocrotalina (DHM), um alcalóide pirrolizidínico. Este por sua vez, inibe a atividade da NADH-desidrogenase, com conseqüente redução dos níveis de ATP. Contudo, a DHM é um alcalóide que apresenta efeitos tóxicos, tanto hepáticos, como cardiovasculares em muitos animais, tais como ruminantes, roedores e até mesmo o homem (Mingatto et al., 2008).

Vários estudos, como os de Farhat et al. (1993), Jasmin et al. (2001), Mingatto et al. (2008), Okada et al. (2008) e Daicho et al. (2009), mostraram que a MCT promove lesão endotelial vascular direta e inflamação dos vasos pulmonares, ocasionando um aumento da resistência arterial pulmonar, acarretando mais tardiamente, fibrose e disfunção cardíaca. Estes constituem-se nos mecanismos disparadores da HAP neste modelo, principalmente no que diz respeito ao aumento da resistência vascular pulmonar, devido a hipertrofia da sua camada muscular lisa com conseqüente redução do lúmen.

² A efetividade da instalação da HAP pela MCT será discutida posteriormente no item “Índice Pulmonar e Histologia”.

³ Aumento significativo observado apenas no grupo WIS-CON-MCT.

Para explicar as elevações hemodinâmicas observadas após o tratamento com MCT (hipertensão arterial e taquicardia) algumas hipóteses devem ser consideradas, tais como: a ocorrência de hipóxia crônica e a hiperatividade simpática, bem como a interação entre estes fatores.

No que diz respeito à hipóxia, observada nos grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT, deve ser considerado as importantes disfunções que esta promove sobre o sistema endotelial, principalmente o pulmonar. O endotélio vascular pulmonar possui um importante papel na patogenia da HAP devido ao seu envolvimento no processo vaso-oclusivo propriamente dito (Larumbe e Escoboza, 1994). Ou seja, as células endoteliais pulmonares podem responder de diferentes maneiras à diferentes injúrias, dentre elas a hipóxia, o estresse de cisalhamento, a inflamação, toxinas ou drogas, resultando em proliferação endotelial anormal e posteriormente na formação de lesões plexiformes (Cool et al., 1999).

Apesar da hipóxia 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). Contudo, 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 PGI_2 em pacientes com HAP (Christman et al., 1992); redução da expressão da PGI_2 sintase em arteríolas pulmonares (Tuder et al., 1999); redução da expressão da ON-sintase (McQuillan et al., 1994; Giaid 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 PA pulmonar e, conseqüentemente, provocando maior dano endotelial. Por outro lado, a ocorrência da hipóxia e a sua manutenção leva a ativação de mecanismos reflexos periféricos de controle ventilatório, tal como o quimiorreflexo, que além de aumento da FR, promove hiperatividade simpática, com conseqüente inotropismo positivo, e aumento da RVP, resultando em aumento da PA (Marshall et al, 2000, Haibara et al, 2002). Inclusive, não pode ser descartada a possível participação dos quimiorreceptores centrais, os quais são ativados de forma mais importante em situações de hipercapnia (Marshall,1987).

Devem ser considerados ainda os efeitos da hipóxia sobre o SRA, bem como sobre o corpúsculo carotídeo, localizado nas bifurcações carotídeas, onde ocorre a transdução de sinais⁴ para a ativação dos quimiorreceptores periféricos⁵. Segundo estudos de Adamy et al (2002), a hipóxia promove uma super-expressão dos receptores AT₁ no coração, os quais também medeiam resposta inotrópica positiva (Bader, 2009) e contribui para o aumento dos parâmetros hemodinâmicos encontrados no presente estudo. Nos corpúsculos carotídeos, a hipóxia também aumenta a expressão dos receptores AT₁ (Leung et al, 2000). A ação da AII sobre o corpúsculo, por sua vez, promove um aumento da sua atividade, potencializando as respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo.

O desenvolvimento e a utilização de modelos adequados de HAP, tal como o da MCT, nos permitiu investigar se drogas inibidoras do SRA, como o captopril e o losartan, são eficazes em reverter o quadro da HAP. É sabido que o captopril atua inibindo a ECA, e conseqüentemente, inibindo a formação de AII. O losartan, por sua vez, é uma droga que atua bloqueando os receptores AT₁ e impedindo que a AII circulante promova seus efeitos. Observamos no presente estudo que tanto animais

⁴ Os estímulos para a ativação dos quimiorreceptores periféricos são a hipóxia, a hipercapnia e diminuição do pH (Marshall, 1994).

⁵ Em ratos, os quimiorreceptores periféricos aórticos não são funcionais (Kobayashi et al, 1999).

Wistar, quanto SHR submetidos a HAP e tratados com estas drogas, tiveram seus parâmetros hemodinâmicos normalizados (PAM, PAS, PAD, PP e FC).

Em 1960, estudos de Segel et al já atribuía à All uma potente ação vasoconstritora pulmonar. Corroborando estes estudos, Lipworth et al (1994) mostrou que a infusão de All no leito vascular pulmonar promove um aumento da PAM pulmonar de forma dose-dependente. Ainda segundo estes estudos, o aumento da resistência vascular pela All é significativamente mais pronunciado ao nível pulmonar, do que sistemicamente sugerindo que o leito pulmonar responde mais intensamente aos efeitos vasoconstritores da All.

A utilização de drogas que bloqueiem o SRA como uma alternativa terapêutica para o tratamento da HAP tem sido estudada por vários investigadores, tanto ao nível experimental (Qing et al, 1992; Bolterman et al, 2005), quanto clinicamente em humanos (Rich et al, 1982; Leier et al, 1983). Os resultados obtidos por estes estudos ainda são bastante divergentes. Alguns demonstram que estas drogas não foram eficientes no tratamento da HAP por não serem capazes de reduzir a pressão na artéria pulmonar (Leier et al, 1983; Cassis et al, 1992). Achados semelhantes foram obtidos por Rich et al. (1982) que também não observaram melhora da PA pulmonar, tanto em repouso como durante exercício físico, em quatro pacientes com HAP submetidos ao tratamento prolongado com captopril. Ao nível experimental, Kreutz et al (1996) mostrou que o tratamento com losartan em ratos com HAP pela MCT falhou em reduzir a PA pulmonar.

Entretanto, outros estudos mostraram que a utilização de drogas que bloqueiem o SRA pode vir a ser uma opção terapêutica. Horowitz et al (1981) mostraram que a administração de pequenas doses de captopril pode melhorar o quadro hemodinâmico do paciente com HAP, ao promover queda da resistência vascular pulmonar, melhorando inclusive a hipoxemia. Da mesma forma, estudos de Okada et al (2008)

mostraram experimentalmente que o captopril atenuou a hipertrofia ventricular induzida pela MCT em ratos.

Uma certa controvérsia quando ao valor terapêutico destas drogas tem sido observada inclusive entre os estudos clínicos e experimentais. Um recente estudo realizado por Metzger et al (2011) poderia ajudar a esclarecer esta questão. Segundo estes autores, há uma maior expressão da ECA na artéria pulmonar de ratos do que em humanos. Este fato talvez pudesse explicar porque os estudos experimentais com captopril, por exemplo, mostraram-se mais eficazes no tratamento da HAP em ratos.

Os efeitos vasculares sistêmicos das drogas que atuam no SRA de indivíduos com HAS isolada já estão bem elucidados. É sabido que algumas das importantes ações destes fármacos para promover diminuição da PA são a diminuição da RVP, da resposta inotrópica, da retenção de sódio e inibição da liberação de aldosterona (Bader, 2009). Porém, em contrapartida, os efeitos destas drogas na vasculatura pulmonar de pacientes com HAP associada ou não à HAS ainda não estão totalmente estabelecidos. É possível que estes efeitos se apliquem à vasculatura pulmonar, promovendo uma diminuição da sua resistência vascular e levando a normalização dos parâmetros hemodinâmicos observados nos animais tratados com estas drogas no presente estudo, uma vez que vários estudos mostram a importante participação dos receptores AT_1 pulmonares na modulação do tônus arteriolar (Marshall, 2003). Este fato poderia ser comprovado pelas análises histológicas, as quais mostraram que os animais tratados com captopril e losartan tiveram a normalização tanto do lúmen, quanto da espessura da parede das arteríolas pulmonares. Com esta diminuição de resistência, a hipoxemia observada seria revertida, devido a melhor perfusão pulmonar, os quimiorreceptores, por sua vez, seriam menos ativados e, conseqüentemente, a hiperatividade simpática seria atenuada, assim como seus efeitos sistêmicos. Contudo, outros importantes efeitos decorrentes da inibição das ações da $Ang II$ não podem ser descartados, tais como a diminuição da liberação de

vasopressina, inibição da ação simpatomimética central, inibição da sede e do apetite ao sal (Bader, 2009).

Um outro mecanismo importante e que deve ser considerado na reversão do quadro de HAP pelo captopril e losartan no presente estudo está relacionado a própria modulação da via angiotensinérgica. Com a inibição da ECA pelo captopril, por exemplo, há uma maior formação de Angiotensina 1-7, que tem um importante efeito vasodilatador pulmonar, cuja resposta é mediada pelos receptor MAS (Fyhrquist e Saijonmaa, 2008). Este efeito vasodilatador pulmonar promoveria uma diminuição da resistência vascular pulmonar, contribuiria para a melhor perfusão pulmonar e, conseqüentemente, na reversão do quadro de HAP, conforme observado pelos parâmetros avaliados neste estudo. A angiotensina 1-7 possui também os seguintes efeitos: anti-hipertrófico, anti-fibrótico e anti-trombótico. Contudo, experimentos adicionais são necessários para avaliarmos o papel relativo destes receptores na mediação desta resposta vasodilatadora pulmonar, bem como no tratamento da HAP.

O bloqueio dos efeitos da All sobre o remodelamento vascular pulmonar é um outro fator a ser considerado. Ou seja, na hipóxia observada na HAP, há uma maior expressão de All, a qual promove a muscularização das arteríolas pulmonares, com conseqüente diminuição do seu lúmen (Marshall, 2003). Isto poderia ser confirmado pelos efeitos benéficos dos inibidores da ECA neste processo, o que contribuiria para o potencial terapêutico destas drogas no tratamento da HAP.

Contudo, a análise dos demais parâmetros hemodinâmicos (PS_{máx}, PDI e PDF) chamam a atenção para algumas respostas diferentes entre o tratamento com as drogas captopril e losartan. Ou seja, ambos os tratamentos melhoraram as pressões de VD dos ratos com HAP (PS_{máx}, PDI e PDF), mas o tratamento com captopril promoveu uma redução mais significativa que o losartan sobre a PS_{máx} e PDF. Ambas as drogas atuam inibindo as ações do SRA, porém, estudos de Fernandes et al

(1995) e Pechanova (2007) sugerem que o mecanismo farmacológico destas drogas pode diferir em função da existência de um radical denominado “tiol” presente no captopril, que é um potente “sequestrador” de radicais livres. Segundo de DeMarco et al (2010), no modelo de HAP induzido por MCT, um dos mais utilizados, ocorre uma rápida resposta inflamatória com presença de níveis elevados de superóxidos. Estes, por sua vez, podem promover danos celulares e teciduais, devido a oxidação dos constituintes celulares. Este estresse oxidativo pode acarretar aterosclerose, insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular, distúrbios respiratórios e hipertensão sistêmica e pulmonar. Assim, o uso de drogas antioxidantes, tal como os miméticos da superóxido dismutase e as drogas que apresentam radical “tiol”, seriam capazes de atenuar tanto a hipertrofia ventricular direita, quanto as pressões vasculares pulmonares destes animais.

No presente estudo, o tratamento com captopril, devido a presença do radical “tiol”, agiria tanto como um antioxidante, como um inibidor da ECA. Já, o tratamento com losartan, que não possui este radical, não atuaria como um antioxidante e revelaria os efeitos da inibição do SRA (bloqueio do receptor AT_1) sobre a HAP. Estudos de Yu-Hui Liu et al (2006), através da análise da peroxidação do endotélio de camundongos, demonstraram a eficácia apenas do captopril na redução dos radicais livres endoteliais, enquanto que o tratamento com enalapril (que não possui o radical “tiol”) não apresentou este efeito protetor. Estes autores também mostraram, através de curvas de relaxamento de anéis isolados de aorta com Ach com lesão endotelial, que animais tratados com captopril apresentaram porcentagens de relaxamento mais significativas que o enalapril. Isto ressalta novamente a importância deste radical. Assim, isto poderia justificar mais uma vez as diferenças encontradas nos parâmetros hemodinâmicos, onde o captopril foi mais eficaz em normalizá-los. Possivelmente, outros modelos de hipertensão arterial pulmonar podem também ser beneficiados com os efeitos antioxidantes desta droga (captopril), uma vez que há descrição de altos

níveis de radicais livres em diversos outros modelos desta doença (DeMarco et al, 2010).

Por outro lado, a presença do radical “tiol” suscitou a possibilidade da HAP ser tratada apenas com drogas antioxidantes. Recentemente, estudos de Csiszar et al (2009) submeteram ratos à HAP pela MCT e ao tratamento com resveratrol (3,5,4_-trihydroxystilbene) por 14 e 21 dias, o qual pertence a uma nova classe de drogas que possuem efeitos citoprotetor, anti-oxidante e propriedades vasoprotetoras anti-inflamatórias. Os resultados destes estudos mostraram que o resveratrol promoveu uma melhora da função endotelial, atenuou o estresse oxidativo, inibiu a inflamação e o remodelamento vascular pulmonar e, conseqüentemente, preveniu o desenvolvimento da HAP. Estes resultados sugerem que o uso de drogas antioxidantes poderia ser útil para a prevenção da HAP, porém permanece por ser esclarecido se poderia tratar a HAP após a sua instalação, tal como foram os protocolos do nosso estudo. Neste contexto, poderia ser sugerido que a presença do radical “tiol” na molécula de captopril pode vir a ser um coadjuvante importante para o tratamento de HAP.

Uma revisão sobre as estratégias terapêuticas na HAP realizada por Puri et al (2007) chama a atenção para uma outra questão: segundo dados bibliográficos, tanto as drogas inibidoras da ECA, como os bloqueadores de receptores de angiotensina, podem ter como efeito adverso e indesejável o desenvolvimento de hipotensão, o que poderia ser uma contra-indicação para o uso destas drogas em pacientes com HAP sem HAS associada. Entretanto, não há um consenso na literatura sobre este efeito hipotensor, uma vez que no estudo realizado por Shin et al (2009), a administração oral de captopril para ratos SHR durante duas semanas apenas normalizou os níveis pressóricos, sem induzir hipotensão sistêmica. Além disto, o efeito adverso hipotensor das drogas relatado por Puri et al (2007) não foi observado em nosso estudo, uma vez que os animais dos grupos WIS-CON-MCT tiveram apenas a normalização dos

valores sistêmicos da PAM após o tratamento tanto com captopril, como com o losartan sem evidência de resposta hipotensora adicional.

Em relação as medidas das pressões do VE (Psmáx, PDI e PDF), as quais apresentaram-se elevadas nos grupos SHR-CON-SAL e SHR-CON-MCT, observamos que os tratamentos com captopril e losartan normalizaram estas pressões de modo equivalente.

Em relação aos ondas atriais "a" (refere-se a pressão desenvolvida pelo átrio direito na sua fase sistólica, isto é, a contração atrial), "c" (refere-se a pressão atrial que ocorre devido ao abaulamento das válvulas átrio-ventriculares em direção ao átrio, devido ao aumento da pressão ventricular) e "v" (refere-se a pressão atrial decorrente do lento fluxo sanguíneo das veias para os átrios, enquanto as válvulas átrio-ventriculares estão fechadas durante a sístole ventricular, a qual culmina com a abertura destas válvulas), observamos que estas foram significativamente aumentadas após o desenvolvimento da HAP, tanto nos animais *Wistar*, quanto SHR. Os tratamentos com captopril e losartan, por sua vez, atenuaram os valores de todas estas pressões atriais. Contudo, observamos que no grupo SHR-LOS-MCT os valores das ondas "a" e "c" ainda permaneceram elevadas em relação ao respectivo grupo controle (SHR-LOS-SAL). As elevações destas ondas atriais poderiam mostrar que o átrio direito está com sua força contrátil aumentada (onda "a"), possivelmente devido a um aumento do retorno venoso (onda "v"), em decorrência da hipoxemia crônica, que, por sua vez, promoveria um aumento do fluxo sanguíneo para os capilares teciduais. Não pode ser descartado, entretanto, o aumento do retorno venoso devido a uma possível venoconstrição, uma vez que estes animais também apresentam um tônus simpático aumentado. Além disso, a maior pressão desenvolvida pelo VD devido ao aumento de pós-carga, também observada neste estudo (PSmáx de VD), poderia explicar o aumento da onda "c", isto é, o maior abaulamento da válvula átrio-ventricular seria decorrente da maior pressão desenvolvida pelo VD devido a HAP. Por outro

lado, a normalização dos valores destas pressões atriais após os tratamentos com captopril e losartan provavelmente está relacionada com a regressão do quadro de HAP, onde o captopril mostrou-se mais eficaz.

2.0 - Índice pulmonar e avaliação histológica

A instalação de HAP foi avaliada no presente estudo através do Índice de Fulton, também denominado Índice Pulmonar. Este índice foi descrito por Fulton et al em 1952 e tem sido utilizado por vários autores (Al Ansari et al, 2007; De La Roque Ed et al, 2010) O Índice Pulmonar tem sido utilizado para se verificar a existência de hipertrofia ventricular direita em experimentos com animais submetidos à HAP, cujo aumento de massa da câmara cardíaca direita constitui-se num dos principais sinais desta doença. A determinação deste índice é baseada na relação entre os pesos dos ventrículos e do septo interventricular, isto é, $VD/VE+septo$.

Em nosso estudo, a análise deste índice evidenciou o desenvolvimento da HAP tanto nos ratos *Wistar*, como nos SHR. Além disso, observamos que os tratamentos com captopril e losartan atenuaram este índice, sugerindo que estas drogas foram eficazes em reverter o quadro de HAP. Entretanto, observamos que, enquanto o grupo SHR-CPT-MCT teve seu valor normalizado, o grupo SHR-LOS-MCT ainda apresentou valores significativamente elevados em relação ao seu respectivo controle (SHR-LOS-SAL) e em relação ao grupo WIS-CON-SAL, sugerindo que o captopril foi mais eficaz no tratamento da HAP.

Para o tratamento com captopril, além do Índice Pulmonar, a regressão da HAP pode ser verificada pela normalização das pressões ventriculares, tanto de VD, como de VE, bem como através da avaliação histológica, a qual será discutida a seguir. Em relação ao losartan, sua eficácia parcial pode ser observada nas medidas de PSmáx e PDF do VD, as quais permaneceram significativamente elevadas em relação ao grupo SHR-CPT-MCT.

Os estudos realizados por Molteni et. Al (1986) corroboram nossos dados em relação ao tratamento com captopril, enquanto que os estudos de Cassis et al (1992) e Kreutz et al (1996) corroboram em parte com nossos achados com o losartan, pois estes observaram que o losartan falhou em reduzir a hipertrofia de VD e a PA pulmonar em ratos com HAP.

Por outro lado, diferente de todos os demais grupos, observamos uma diminuição significativa do Índice Pulmonar no grupo SHR-CON-SAL, a qual está associada a uma característica relevante que é observada nos ratos SHR, intimamente relacionada com as disfunções vasculares periféricas. Trata-se da hipertrofia ventricular esquerda, cujo desenvolvimento também está associado à forte ativação do SRA (Paul et al, 2006; Barder, 2009). O valor significativamente aumentado do VE+septo torna o valor deste índice significativamente menor.

A hipertrofia do VD é um achado comum nos ratos tratados com MCT. Já a hipertrofia desta câmara e fibrose pode ser observada mais tardiamente. Estudos realizados por Daicho et al. (2009) examinaram o VD de ratos até 8 semanas após o tratamento com MCT. Estes autores observaram uma aparente fibrose intersticial no VD na 6ª semana, a qual seria responsável pelo aumento da pressão sistólica de VD. Além desta fibrose, uma diminuição do débito cardíaco e volume sistólico foram observadas na 6ª e 8ª semanas, sugerindo um quadro de insuficiência cardíaca direita. No que se refere ao presente estudo, as avaliações feitas nos grupos WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT foram após 3 semanas de tratamento, quando observa-se principalmente a hipertrofia da camada média das arteríolas pulmonares. Assim, a hipertrofia de VD observada em nossos animais seria uma consequência do aumento da pós-carga no VD, e não uma consequência de uma insuficiência desta câmara.

A hiperatividade simpática observada nos animais com HAP neste estudo, assim como o aumento da expressão pulmonar dos receptores α_1 -adrenérgicos (Salvi, 1999)

poderiam estar contribuindo para o aumento da resistência vascular pulmonar, aumento da pós-carga do VD e sua consequente hipertrofia ventricular direita. No entanto, o papel dos receptores adrenérgicos na modulação do tônus das arteríolas pulmonares tem despertado o interesse de vários investigadores. Os receptores α_1 -adrenérgicos na vasculatura pulmonar desempenham um importante papel na regulação do tônus vascular pulmonar e contribuem para o desenvolvimento estrutural desta vasculatura através da regulação intranuclear e da síntese proteica (Salvi, 1999). Estudos de Leung et al (2000) mostraram que a exacerbação do SRA, tal como ocorre nos animais SHR, promove uma facilitação da neurotransmissão adrenérgica pré-sináptica. Por outro lado, o estímulo dos receptores β -adrenérgicos inibe este processo e promove vasodilatação pulmonar (Porcelli et al. 1977). Na circulação pulmonar normal, há uma predominância da atividade β -adrenérgica, favorecendo a vasodilatação e inibindo os fatores de crescimento. Entretanto, nos períodos de hipóxia crônica, como observado na HAP através da MCT, há uma maior expressão dos receptores α_1 -adrenérgicos⁶ e uma diminuição dos receptores β -adrenérgicos, predominando os efeitos vasoconstritores. Estes efeitos poderiam ainda ser potencializados pela hiperatividade simpática observada nestes animais, o que aumentaria ainda mais o tônus da vasculatura pulmonar. Esta constitui a hipótese α_1 -adrenérgica da HAP (Salvi, 1999).

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 das arteríolas pulmonares, acompanhados de uma redução também significativa do lúmen destas. Esta redução

⁶ Durante a privação de O_2 observada na hipóxia, os estoques de energia do músculo liso vascular são rapidamente depletados. Para manter o desenvolvimento de tensão é necessário um contínuo suprimento de energia. Prévios estudos tem mostrado que a extração de glicose do sangue para o tecido muscular é aumentado pela estimulação dos receptores α_1 -adrenérgicos, os quais translocam os transportadores GLUT1 e GLUT4 do citoplasma para a membrana celular (Yajima e Ui, 1977; Faintrenie e Goelen, 1998).

foi da ordem de 40% no grupo WIS-CON-MCT e de 68% no grupo SHR-COM-MCT, e normalizou em todos os grupos tratados com as drogas inibidoras do SRA. Porém, vale a pena ressaltar que quando os grupos SHR-LOS-MCT e SHR-CPT-MCT foram comparados, o tratamento com captopril propiciou novamente um aumento mais significativo do lúmen em relação ao tratamento com losartan.

Podemos observar que na literatura, a grande maioria dos estudos experimentais que investigam a HAP e a eficácia de tratamentos terapêuticos nesta doença, não utilizam a análise histológica como método complementar para avaliar a eficácia dos tratamentos. Entretanto, alguns autores que utilizaram o mesmo modelo de HAP que o nosso, observaram dados semelhantes, ou seja, redução do lúmen dos vasos pulmonares associado ao aumento da musculatura vascular e aumento da relação da parede/lúmen (Ludke et al, 2010; Csiszar, 2011).

Em contrapartida, resultados diferentes aos nossos foram obtidos no estudo realizado por Suylen et al (1998), os quais não observaram regressão no quadro de HAP induzida pela MCT através das análises histológicas dos animais submetidos ao tratamento crônico com captopril. Acreditamos que algumas diferenças metodológicas possam justificar as diferentes respostas obtidas, uma vez que a administração da droga no estudo supra citado era através de uma bomba de infusão implantada na região subcutânea dos animais, e a dose administrada era de 0,5 mg/Kg/h, o que corresponde a uma infusão de 12 mg/kg/dia. Em nosso estudo, a dose de captopril administrada foi de 100 mg/kg/dia, o que nos permite supor que, embora a administração contínua tenha como ponto positivo possibilitar a manutenção de níveis plasmáticos da droga, a dose total diária que os animais de nosso estudo receberam foi muito superior, podendo assim justificar a expressiva melhora destes.

3.0 – Avaliação Autônoma

A avaliação dos componentes autonômicos simpático e parassimpático cardíacos também foi feita no presente estudo através das alterações de FC após os bloqueios farmacológicos com atenolol (antagonista dos adrenoceptores β_1) e metil-atropina (antagonista muscarínicos não seletivo). Nossos resultados mostraram inicialmente que os animais SHR-CON-SAL apresentaram um aumento do componente simpático em relação ao grupo WIS-CON-SAL e uma diminuição do componente parassimpático. Estudos de Mestivier et al (2001) corroboram estes achados, os quais mostraram que os animais SHR apresentam um tônus simpático cardíaco aumentado associado com uma redução do tônus parassimpático. Uma hipótese para explicar esta hiperatividade simpática em animais SHR seria a presença da hipóxia. Estudos de Sun e Reis (1994) mostraram que os neurônios reticuloespinhais localizados no RVLM⁷, um dos mais importantes centros geradores de atividade simpática, são diretamente estimulados pela hipóxia, cujo mecanismo envolve a ativação dos quimiorreceptores arteriais.

Os animais submetidos a HAP com MCT (*Wistar* e SHR), por sua vez, também apresentaram um significativo aumento do componente simpático com concomitante redução do componente parassimpático. Estudos experimentais de Ishikawa et al (2009) também observaram, através de bloqueios farmacológicos, que a progressão da HAP pela MCT promove um aumento da atividade nervosa simpática. Clinicamente também foram observados aumentos na atividade eferente simpática em pacientes portadores de HAP (Velez-Roa et al, 2004).

Observamos também que os tratamentos com captopril e losartan alterou significativamente estes componentes. O tratamento com captopril no grupo SHR-CPT-MCT normalizou os valores dos componentes simpático e parassimpático quando comparado ao grupo WIS-CON-SAL. Porém, o tratamento com losartan apenas os

⁷ A sigla RVLM (Rostral Ventrolateral Medulla), originária da língua inglesa, foi utilizada neste estudo para denominar a "Área Bulbar Ventrolateral Rostral".

atenuou, trazendo-os de volta a condição inicial observada nos grupos SHR-CON-SAL e SHR-LOS-SAL. Estes resultados sugerem que o captopril foi mais eficaz em restabelecer a atividade dos componentes autonômicos dos animais submetidos a HAP pela MCT.

Algumas hipóteses para explicar a hiperatividade simpática observada nos animais submetidos a HAP seriam: a) ativação dos quimiorreceptores; b) atenuação do ganho barorreflexo e c) modulação do sistema respiratório sobre o sistema cardiovascular.

Inicialmente, em relação aos quimiorreceptores periféricos, estes são localizados nos corpúsculos carotídeos de ratos (Sapru e Krieger, 1977), e são ativados fisiologicamente pela hipóxia, hipercapnia e redução do pH. Como anteriormente discutido, as respostas cardiovasculares desencadeadas são simpato-excitação (aumento da PA) e parassimpato-excitação (bradicardia), além de respostas respiratórias (hiperpnéia e taquipnéia) (Haibara et al., 1995). Considerando o presente estudo, a hipoxemia observada nos grupos tratados com MCT poderiam estar promovendo a estimulação destes receptores, e estes por sua vez estariam contribuindo para a hiperatividade simpática.

Considerando-se ainda 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, no que se refere aos animais SHR, vários autores mostraram que o ganho barorreflexo está atenuado nestes animais (Andresen et al, 1978, Gordon et al, 1981; Thames et al, 1984; Salgado et al, 2006). 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, 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, 2009). 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, 2009). 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. Assim, no que se refere ao presente estudo, o aumento da FR poderia estar mediando este efeito vagolítico mediado pelos circuitos respiratórios centrais.

Outro fator respiratório 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, porém não podem ser descartados no que se refere a contribuição para a disautonomia observada, uma vez que os animais com HAP apresentaram um significativo aumento do V_C .

4.0 - Avaliação Respiratória e Gasométrica

Observamos em nossos animais que os parâmetros gasométricos e ventilatórios foram modificados apenas nos animais que receberam MCT e desenvolveram HAP. Como acima discutido, a MCT causa um aumento da camada média dos vasos pulmonares com conseqüente redução do lúmen e aumento da resistência vascular pulmonar (Suylen et al, 1998). Além disso, sabe-se que a MCT desencadeia uma cascata inflamatória e acredita-se que ocasione alterações pulmonares intersticiais, dificultando assim a troca gasosa (Schwenke et al, 2009). Desta forma, sabendo-se do desenvolvimento de mudanças estruturais do parênquima pulmonar em associação com alterações vasculares pulmonares em animais com HAP induzida por MCT, podemos sugerir que estes animais tiveram um comprometimento da relação ventilação/perfusão pulmonar e uma menor eficácia das trocas gasosas.

No presente estudo, realizamos a avaliação de parâmetros de ventilação pulmonar (V_C , FR, V_{min} e V_A) utilizando a técnica de pletismografia de corpo inteiro. Esta técnica, descrita por Malan (1973), permite a avaliação respiratória do animal de forma não-invasiva e sem o efeito anestésico. Para complementar a avaliação respiratória e verificar o equilíbrio ácido-básico, realizamos também a análise gasométrica, através da coleta de sangue arterial.

Nossos dados sugerem que os animais que receberam MCT e desenvolveram HAP apresentaram uma menor eficácia ventilatória, uma vez que, embora estes grupos tenham apresentado um aumento dos parâmetros ventilatórios (FR, V_C , V_{min} , V_A), este foi acompanhado de uma piora da troca gasosa, o que se evidenciou pela análise gasométrica, que apresentou um padrão de hipoxemia (redução da pO_2) e redução de SaO_2 , associada à retenção de CO_2 , ocasionando uma maior acidose (redução do pH) e aumento de bicarbonato, provavelmente como um mecanismo compensatório.

Uma vez que, apesar do aumento da ventilação, estes animais tiveram uma piora da gasometria, acreditamos que o desenvolvimento de um padrão ventilatório mais “rápido e profundo” ocorreu como uma tentativa compensatória à hipóxia e hipercapnia. Sabe-se que as modificações dos níveis tensionais de CO_2 e O_2 do sangue arterial pode ser detectada através de quimiorreceptores periféricos e centrais, os quais, uma vez ativados, geram mecanismos compensatórios. O aumento de CO_2 gera uma estimulação dos quimiorreceptores centrais, enquanto a redução da pO_2 ativa os quimiorreceptores periféricos, e ambas as alterações gasométricas (aumento de pCO_2 e redução de pO_2), tem como resposta uma hiperventilação, ocasionada por aumento de frequência e/ou profundidade da respiração (Kara et al, 2003).

No presente estudo, não realizamos análise do quimiorreflexo, entretanto, em função dos nossos achados, podemos sugerir que a ativação deste esteja associado com a resposta ventilatória observado nos grupos tratados com MCT (WIS-CON-MCT e SHR-CON-MCT).

As alterações ventilatórias têm sido pouco estudadas na HAP experimental, 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 da FR no modelo de HAP induzida por MCT foi documentado anteriormente por Brown et al (1998), o qual observou uma taquipnéia associada a sinais de “desconforto respiratório”. Estes autores correlacionam estes achados com uma diminuição da densidade dos adrenoceptores- 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 adrenoceptores- β_2 nos pulmões nesse modelo poderia trazer implicações respiratórias importantes, uma vez que a broncoconstrição poderia diminuir o fluxo aéreo para os alvéolos promovendo um quadro de hipoxemia e/ou hipercapnia, que seria compensada reflexamente com uma elevação da FR, tal como observada em nosso estudo, além de um maior esforço respiratório.

O esforço respiratório é um parâmetro subjetivo e não mensurável em animais, o que justifica o fato de não termos incluído esta informação em nossos resultados. Entretanto, através da observação dos animais tratados com MCT, podemos sugerir que estes animais tiveram uma piora do padrão respiratório, uma vez que os mesmos apresentavam sinais visíveis de desconforto respiratório, o que corrobora com os achados de Brown et al (1998).

Após os animais com HAP terem sido submetidos aos tratamentos com as drogas propostas (losartan e captopril), os parâmetros ventilatórios e gasométricos tiveram uma melhora e, em alguns grupos, até a normalização, porém a magnitude da melhora de alguns parâmetros foi mais significativa em resposta ao tratamento com captopril em relação ao losartan.

Os grupos tratados com captopril (WIS-CPT-MCT e SHR-CPT-MCT) tiveram todos os seus parâmetros ventilatórios e gasométricos normalizados ao final do tratamento, ou seja, semelhantes ao grupo WIS-CON-SAL. Acreditamos que a normalização da ventilação pulmonar e trocas gasosas destes animais seja resultante da melhora da perfusão pulmonar (parâmetros histológicos), inicialmente, devido a diminuição da resistência vascular pulmonar, e, num segundo momento, dos parâmetros hemodinâmicos observados nestes grupos (WIS-CPT-MCT e SHR-CPT-MCT). Ou seja, uma vez que esta droga conseguiu reverter as principais consequências causadas pela HAP no sistema cardiopulmonar, ocasionando a melhora da perfusão pulmonar em associação com a melhora dos parâmetros morfométricos e restauração do lúmen, era esperado uma menor ativação do quimiorreflexo e dos mecanismos compensatórios, com normalização da ventilação e troca gasosa.

Em relação aos grupos tratados com losartan (WIS-LOS-MCT e SHR-LOS-MCT), podemos observar que apesar de todos os parâmetros ventilatórios e gasométricos terem melhorado de forma significativa, nem todos normalizaram. Dentre os parâmetros gasométricos analisados, apenas o bicarbonato normalizou após o tratamento com losartan, enquanto o pH, o PaCO₂ e a PaO₂ normalizaram apenas no grupo WIS-LOS-MCT, não normalizando no grupo SHR-LOS-MCT, ou seja, este grupo (SHR-LOS-MCT), quando comparado ao grupo correspondente tratado com o captopril (SHR-CPT-MCT) apresentou uma melhora gasométrica menos significativa. A resposta da SaO₂ ao tratamento com losartan foi ainda pior, uma vez que este parâmetro não melhorou de forma significativa no grupo SHR-LOS-MCT, permanecendo semelhante ao SHR-CON-MCT e diferente dos valores normais, ou seja, diferente do grupo WIS-CON-SAL.

Um estudo realizado por Adamy et al (2002), demonstrou que presença de hipóxia crônica em animais com HAP pode agravar ainda mais o curso da doença, uma vez que a redução de oxigenação arterial tem como uma das consequências, o aumento

da expressão dos receptores de All. Uma vez que sabidamente o aumento de All pode gerar repercussões hemodinâmicas, tais como hipertrofia ventricular e efeito cronotrópico positivo, a manutenção de baixa saturação de hemoglobina nos animais SHR observada em nossos animais, mesmo após o tratamento com losartan, pode ter contribuído com a melhora menos expressiva destes parâmetros no grupo SHR-LOS-MCT.

No que se refere aos estudos das variáveis ventilatórias em animais SHR, tal como FR, V_C , V_{min} e V_A , observamos que há na literatura muito poucos estudos. Recentemente, Sugimura et al (2008) mostrou que animais SHR quando submetidos a hipóxia apresentam um aumento mais significativo da FR do que ratos *Wistar*. Estes resultados poderiam sugerir que os mecanismos centrais de regulação da respiração em animais SHR poderiam estar alterados. Nota-se contudo, que estes autores observaram um discreto aumento da FR em repouso nestes animais, embora não estatisticamente significativo quando comparados aos seus controles. Em nossos resultados, por sua vez, os animais SHR mostraram um aumento significativo da FR em repouso, o que reforça a hipótese de que o padrão respiratório nestes animais parece estar alterado. Obviamente que estudos adicionais são necessários para melhor entendermos esta questão neste modelo de animais.

Nos grupos tratados com losartan o padrão de resposta dos parâmetros ventilatórios foi semelhante às respostas gasométricas, ou seja, a FR melhorou porém não normalizou e o V_C , V_{min} e V_A normalizaram apenas no grupo WIS-LOS-MCT, não normalizando no grupo SHR-LOS-MCT, ou seja, este grupo (SHR-MCT-LOS) quando comparado ao grupo correspondente tratado com o captopril (SHR-CPT-MCT) apresentou uma melhora ventilatória menos significante. Contudo, vale salientar que não encontramos estudos que comparassem as respostas ventilatórias e gasométricas ao tratamento com captopril e losartan em ratos com HAP induzida por MCT.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Nossos estudos mostraram que o tratamento por 3 semanas com MCT promove um quadro de HAP em ratos *Wistar* e SHR, promovendo significativas alterações cardiovasculares, respiratórias, gasométricas e autonômicas, as quais foram agravada em animais SHR. O tratamento com captopril foi eficiente para normalizar todos os parâmetros estudados após a instalação da HAP, no entanto, o losartan não foi eficiente em normalizar alguns parâmetros, principalmente o índice pulmonar, o qual é um importante indicador da HAP. Os resultados do presente estudo nos permitem sugerir que os bloqueadores do sistema renina angiotensina, particularmente o captopril, um inibidor da ECA, possui maior eficácia terapêutica em relação ao losartan, um antagonista dos receptores AT₁, no tratamento da HAP induzida pela MCT, tanto em ratos *Wistar*, como em SHR.

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.
- ADAMY C, OLIVIERO O, EDDAHIBI S, RAPPAPORT L. Cardiac modulations on ANG II receptor expression in rats with hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 283, p. 733-740. 2002.
- AL-ANSARI E, DU H, YU L, OCHOA D, HARI G, QUINN D, HALES C. Low-molecular-weight heparina inhibits hypoxic pulmonary remodeling in guinea pigs. *Chest*, v. 132, p. 1898-1905. 2007.
- AMBROZ C, CLARK AJ, CATT KJ The Mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochem Biophys Act*, v. 1133, p. 107-111, 1991.
- ANDRESSEN M, KRAUHS J, BROWN A. Relationship of aortic wall and baroreceptor properties during development in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research*, v. 43, p. 728-738. 1978.
- 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.

- AVERILL DB, DIZ DI. Angiotensin peptides and the baroreflex control of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Research Bull.* v. 51, n. 2, p. 119-128, 2000.
- BADER M. Tissue rennin-angiotensin-aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v. 50, p. 439-65, 2010.
- BADESCH D, ABMAN S, AHEARN G, et al. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension. *Chest*, v. 126, p. 35-62, 2004.
- BARNES PJ. Effect of beta-agonists on inflammatory cells. *J Allergy Clin Immunol*, v. 104, p. 10-17, 1999.
- BARST RJ, DINGEMANSE J, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of bosentan in pediatric patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin Pharmacol Ther*, v. 73, p. 372, 2003.
- BOGAARD H, ABE K, NOORDEGRAF AV, VOELKEL NF. The right ventricle under pressure. *Chest*, v. 135, p. 794-804, 2009.
- BOLTERMAN RJ, MANRIQUEZ MC, RUIZ MCO, et al. Effects of captopril on the renin angiotensin system, oxidative stress, and endothelin in normal and hypertensive rats. *Hypertension*, v. 46, n. 2, p. 943-947, 2005.
- 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.
- CASSIS L, RIPPETOE P, PAINTER D, FITZ R, GILLESPIE M. Angiotensin II and monocrotaline-induced pulmonary hypertension: effect of losartan (DuP

753), a nonpeptide angiotensin type 1 receptor. *J pharmacol Exp Ther*, v. 262, n. 3, p. 1168-72. 1992.

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.

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.

CHU D. a new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiotensin – 1. *General Thoracic*, 449 – 457, 2004.

CINGOLANI O, YANG X, CAVASIN A, CARRETERO A. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, v. 41, p. 249-254. 2002.

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.

CSIZAR A, LABINSKY N, OLSON S, PINTO J. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension*, v. 54, p. 668-675. 2009.

D'ALONZO GE, BARST RJ, AYRES SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. *Annals of Internal Medicine*, v.115, p. 343-49, 1991.

DAICHO T, YAGI T, TAKANO S, et al. Alterations in pharmacological action of the right ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*, v. 32, n.8, p. 1378-84, 2009.

- 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.
- DDAHIBI 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.
- DE MARCO T. Pulmonary arterial hypertension and woman. *Cardiol*, v. 14, p. 312-18, 2006.
- 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.
- DICKHOUT J, LEE R. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, v.43, p. 794-800. 1998.
- DRAZEN JM, TAKEBAYASHI T, LONG NC, SHORE AS. Animal models of asthma and chronic bronchitis. *Clin Exp Allergy*, 29(S2): 37-47; 1999.
- EKAS D, MUSTAFA F. Sympathetic nerve function and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*, v. 241, p. 379-384, 1981.
- FAINTRENIE G, GOELEN A. α -₁adrenergic stimulation of glucose uptake in rat white adipocytes. *J Pharmacol Exp*, v. 286, p. 607-610, 1998.
- FARBER HW & LOSCALZO J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 351, p. 1655-65, 2004.
- FARHAT MY, CHEN M, BHATTI T, IQBAL A, et al. 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.

- FEHRENBACH H. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease: some critical remarks. *Pathobiology*. v. 70, n. 5, p. 277-83, 2003.
- FERNANDES AC, FILIPE PM, FREITAS JP, MANSO CF. Different effects of thiol and nonthiol ACE inhibitors on copper-induced lipid and protein oxidative modification. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, p. 507-14, 1996.
- FERRARIO C. M., CHAPPELL M. C., TALLANT E.A., BROSNIHAN K.B., DIZ D.I. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. v. 30, n.2, p. 535-541, 1997.
- FONTES MAP, BALTATU O, CALIGIORNE SM, et al. Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medula contribute to hypertension of TRG (mREN2)27 rats. *Physiol Genomics*. v.2, p. 137-142, 2000.
- FYHRQUIST F, SAIJONMAA O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*, v. 264, p. 224-236, 2008.
- GAINE SP, RUBIN LJ. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, v. 352, p. 719-25, 1998.
- GALIE N, GHOFRANI HA, TORBICKI A ET AL. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med*, 2005; 353 (20): 2148-2157
- GALIE N, TORBIEKI A, BARST R. "Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension of the European society of cardiology. *Eur Heart J*, v. 25, p. 2243-78, 2004
- GIADID A, SALEH D. Reduced expression of endothelial nitric oxide syntase 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.

GORDON F, MATSUGUCHI H, MARK A. Abnormal baroreflex control of heart rate in prehypertensive and hypertensive Dahl genetically salt-sensitive rats. *Hypertension*, v. 3, p. 135-41.1981.

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* 101 (1-2): 60-67, 2002.

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.

HENRICH W, LEVI M. Ontogeny of renal rennin release in spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat. *Am. J. Physiol*, v. 260, p. 530-535, 1991

HERNÁNDEZ G, ORTIZ G, SÁNCHEZ L. Captopril therapy

HERVÉ P, LAUNAY J, SCROBOHACI M, et al. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*, v. 99, p. 249-54, 1995.

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.

- HOROWITZ J, OLIVER E, GOBLE A, BRENNAN J, HARDING D, LOUIS W. Effects of captopril (SQ 14,225) in patient with primary pulmonary hypertension. *Postgraduate Medical Journal*, v. 57, p. 115-116.
- HUMBERT M, SITBON O, CHAOUAT A, et al. Pulmonary arterial hypertension in france. *Am J Resp Crit Car*. v. 173, p. 1023-30, 2006.
- HUMBERT M, SITBON O, SIMONNEAU GS. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, v. 351, p. 1425-36, 2004.
- 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.
- ISHIKAWA M, SATO N, ASAI K, TAKANO T, MIZUNO K. Effects of purê α/β – adrenergic receptor blocker on monocrotalina – induced pulmonary arterial hypertension with right ventricular hypertrophy in rats. *Circulation Japanese Society*. 2009.
- ITO KM, SATO M, USHIJIMA K, NAKAI M, ITO K. Alterations of endothelium and smoth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 279, p. 1786-95, 2000.
- ITO S, SVED AF. Pharmacological profile of depressor response elicited by sarthran in rat ventrolateral medulla. *Am J. Physiol Heart Circ*. v. 279, p. 2961-66, 2000.
- JACKSON TR, BLAIR AC, MARSHALL J, et al. The Mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, v. 335, p. 437-440, 1988.
- 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.
- KARA T, NARKIEWICZ K, SOMERS V. Chemoreflexes – physiology and clinical implications. *Cta Physiol Scand*, v. 177, p.377-84, 2003.

- KREUTZ R, ALFONSO MS, GANTEN D, PAUL M. Effect of losartan on right ventricle hypertrophy and cardiac angiotensin I-converting enzyme in pulmonary hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, v. 18, n. 1, p. 101-11. 1996.
- LA ROQUE E, THIAUDIÈRE E, DUCRET T, MARTHAN R, FRANCONI J, GUIBERT C, PARZY E. Effect of chronic hypoxia on pulmonary artery blood velocity in rats as assessed by electrocardiography-triggered three-dimensional time-resolved MR-angiography. *NMR Biomed*, v. 24, p. 225-230. 2011.
- LANE KB, MACHADO RD, PAUCIULO MW, THOMSON JR. Heterozygous germline mutations in BMPR2, 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 pulmonare primaria. *Rev Invest Clin*, v. 46, p. 421-25, 1994. *Rat lung. Chest*, v. 114, p. 35-36, 1994
- LE CRAS, ROBERT C. Effects of chronic hypoxia and altered hemodynamics on endothelial nitric oxide synthase and preproendothelin-1 expression in the adult
- LEE SD, SHROYER KR, MARKHAM NE, et al. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*, v. 101, p. 927-34, 1998.
- LEIER C, BAMBACH D, NELSON S, HERMILLER J, HUSS P, MAGORIEN R. Captopril in primary pulmonary hypertension. *Circulation*, v. 67, n.1, p.155-161. 1983.
- LEUNG P, LAM S, FUNG M. Chronic hypoxia upregulates the expression and functions of AT₁ receptors in rat carotid body. *Journal of Endocrinology*, v.167, p. 517-524. 2000.

- LIPWORTH JB, DAGG k. Vasoconstrictor effects of angiotensin II on the pulmonary vascular bed. *Chest*, 105:1360-64, 1994.
- LIU Y, LIU L, WU J, CHEN S, SUN Y. Comparison of captopril and enalapril to study the role of the sulfhydryl-group in improvement of endothelial dysfunction with ACE inhibitors in high dose dieted methionine mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 47, n. 1, p. 82-88. 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.
- LUDKE ARL, MOSELE F, CARON-LIENERT R, et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. *J cardiovascular Pharmacol*, v. 55, p. 89-95, 2010.
- 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.
- MARCHE TH, GREEN FH, HAHN FF, NIKULA KJ. Animal models of emphysema and their relevance to studies of particle-induced disease (Review). *Inhal Toxicol*. 12, Suppl 4:155-87, 2000.

- MARSHALL HW, CLARKE JA, DALY JM, HENNESSY EM. Quantitative studies of the vasculature of the carotid body in the chronically hypoxic rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 331-340; 2000.
- MARSHALL JM. Analysis of cardiovascular response evoked following changes in peripheral chemoreceptor activity in the rat. *J. Physiol*. 393-414. 1987.
- MARSHALL P. The pulmonary renin-angiotensin system. *Current pharmacological design*, 9, 715-722, 2003
- McLAUGHLIN VV, McGOON MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, v. 114, p. 1417-31, 2006
- 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.
- 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, 2008.
- MESTIVIER D, DABIRÉ H, CHAU N. Effects of autonomic blockers on linear and nonlinear indexes of blood pressure and heart rate in SHR. *Am J Heart Circ Physiol*, v. 281, p. 1113-1121. 2001.
- METZGER R, FRANKE FE, BOHLE RM, et al. Heterogeneous distribution of angiotensin I-converting enzyme (CD143) in the human and rat vascular systems: vessel, organ and species specificity. *Microvascular Research*, v. 81, p. 206-215, 2011.
- 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.
- MINGATTO F, MAIOLI M, BRACHT A, IWAMOTO E. Effects of monocrotalina on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology Letters*, v. 182, p. 115-120. 2008.
- MIYAZAKI M, TAKAI S, JIN D, MURAMATSU M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther*, v. 112, p. 668-76, 2006.
- MOLTENI A, WARD W, TS'AO C, SOLLIDAY N. Monocrotaline-induced cardiopulmonary damage in rats: amelioration by the angiotensin-converting enzyme inhibitor CL242817. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 182, n.4, p. 483-493. 1986.
- 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.
- MORREL N. ATOCHINA E, MORRIS K. *Clin. Invest*, 96, 1823. 1995
- 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.
- NICOLLS MR, TARASEVICIENE-STEWART L, RAI PR, et al. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J*, v. 26, p. 1110-1118, 2005.
- 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.

NIKULA KJ, GREEN FH. Animal models of chronic bronchitis and their relevance to studies of particle-induced disease (Review) *Inhal Toxicol*. 12 Suppl 4:123-53, 2000.

NOOTENS M, WOLFKIEL C, CHOMKA EV et al. Understanding right and left ventricular systolic function and interactions at rest and with exercise in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*, v. 75, p. 374-7, 1995

NUNEZ E, HOSOYA K, SUSIC D, FROHLICH ED. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR. *Hypertension*, v. 29, p. 519 – 524, 1997.

OKADA M, KIKUZUKI R, HARADA T, HORI Y, YAMAWAKI H, HARA Y. Captopril attenuates matrix metalloproteinases-2 and -9 in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in rats. *J Pharmacol Sci*, v. 108, p. 487-494. 2008.

OKAMOTO K, AOKI K. Development of strain of spontaneously hypertensive rats. *Hypertensive Circulation Journal*, v. 27, p. 282 – 293, 1963.

OKUNISHI H, KAWAMOTO T, KUROBE Y, OKA Y, ISHII K, TANAKA T, MIYAZAKI M. Pathogenic role of vascular angiotensin-converting enzyme in the spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 18, p. 649-659, 1991.

PALEVSKY HI, SCHLOO BL, PIETRA GG, et al. Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation*, v. 80, n. 5, p. 1486-88, 1989.

PATON JFR, WALKI H. Is neurogenic hypertension related to vascular inflammation of the brainstem? *Neurosci Biobehav*, p. 1-6, 2008.

PAUL M, MEHR A, KREUTZ R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, v. 86, p. 747-803. 2006.

- PEACH M J. The rennin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. *Physiol. Rev.* v. 55, p. 313-369, 1977.
- PEACOCK AJ, MURPHY NF, McMURRAY JJV, et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, v. 30, p. 104-109, 2007.
- PECHÁŇOVA O. Contribution of captopril thiol group to the prevention of spontaneous hypertension. *Physiol Res*, v. 56, p. 41-48. 2007.
- PLUNKETT L, SAAVEDRA. Increased angiotensin II affinity in the nucleus tractus solitaries of spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci*, v. 82, p. 7721-24, 1985
- PORCELLI R, VIAU A, DEMENY M, NAFTCHI N, BERGOFISKY H. Relation between hypoxi pulmonary vasoconstriction, its humoral mediators and alpha-beta adrenergics receptors. *Chest*, v. 71, p. 249-251. 1977.
- PURI A, McGOON M, KUSHWAHA S. Pulmonary arterial hypertension: current therapeutics strategies. *Nature Clinical Prattice*, v. 4, n. 6, p. 319-350. 2007
- QING G, GARCIA R. Chronic captopril and losartan (DuP 753) administration in rats with high-output heart failure. *American Physiology Society*, v. 32, p. 833-840. 1992.
- REICHART E, BOERKMANN P, PLENAT F. Parenteral administration of trypsin triggers lung emphysema. *Eur Respir J*, v. 5, n. 7, p. 810-4, 1992.
- REIS A, ROCHA N, BARROS R, et al. Recomendações para abordagem clínica do doente com hipertensão pulmonar. *Ver Port Cardiol*, v. 29, n. 2, p. 253-89, 2010.
- 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, MARTINEZ J, LAM W, ROSEN KM. Captopril as treatment for patients with pulmonary hypertension – problem of variability in assessing chronic drug treatment. *Br Heart J*, v. 48, p. 272-77, 1982.
- ROKS AJM, VAN GEEL PP, PINTO YM, et al. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human rennin-angiotensin system. *Hypertension*, v. 34, p. 296-301, 1999.
- ROSSOUW JE. Hormones, genetics factors and gender differences in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, v. 53, p. 550-557, 2002.
- RUBIN LJ, BADESCH DB, BARST RJ. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, p. 346:896, 2002
- 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.
- RUIZ P, BASSO N, CANNATA M. The renin-angiotensin system in diferente stages of spontaneously hypertension in the rat (SHR). *Clin Exp Hypertension Theory Pract*. v. 12, p. 63-81, 1990
- RUNO JR & LOYD JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*, v. 361, p.1533-44, 2003.
- SAAVEDRA J M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr. Rev.* 13: 329-280, 1992.
- SALGADO H, BARALE A, CASTANIA A. *Baroreflex responses to eletrical stimulation of aortic depressor nerve in concious rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 292, p. 593-600, 2006

- SALVI SS. α_1 -Adrenergic hypothesis for pulmonary hypertension. *Chest*, v. 115, p. 1708-19, 1999.
- SANTOS RAS, CAMPAGNOLE-SANTOS MJ. Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 27, p. 1033-47, 1994.
- SANTOS RAS, SIMOES E SILVA AC, MARIC C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *PNAS*, v. 100, n. 14, p. 8258-63, 2003.
- SANTOS RAS., CAMPAGNOLE-SANTOS M J, ANDRADE SP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regulatory Peptides* v. 91, p.45-62, 2000.
- SAPRU HN & KRIEGER AJ. Carotid and aortic chemoreceptor function in rat. *Exercise Physiol*, v. 42, n. 3, p. 344-48, 1977.
- SCHIFFRIN EL, THOMÉ FS, GENEST J. Vascular angiotensin II receptor in SHR. *Hypertension*, v. 6, p. 682-88, 1984.
- SCHWENKE D, PEARSON J, SHIMOCHI A, KANGAWA K, TSUCHIMOCHI H, SHIRAI M, CRAQQ P. Changes in pulmonary blood flow distribution in monocrotaline compared with hypoxia-induced models of pulmonary: assessed using synchrotron radiation. *J Hypertens*, v. 27, p. 1410-0, 2009.
- SEGEL N, HARRIS P, BISHOP J. The effects of synthetic hypertension of the systemic and pulmonary circulations in man. *Clin Sci*, v. 20, p. 49-61. 1961.
- SHIN C, CHOI W, NAN M, MYUNG C. Synergic decrease in blood pressure by captopril combined with losartan in spontaneous hypertensive rats. *Arch Pharm Res*, v. 32, n. 32, p. 955-962. 2009.

- SHIRAISHI M, YOSHIDA M. levels of alpha-elastin of desmosine as index of induced lung injury in rats. *Nihon Kyobu Shikkan*, 404-12, 1996
- SIMON J, GIBBS R, et al. "Consensus statement on the management of pulmonary hypertension in clinical practice in UK and Ireland. *Thorax*, v. 63, 2008.
- 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.
- SPYER KM, GOURINE, A.V. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci*, v. 364 p. 2603 – 2610, 2009.
- 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 Metab*, v. 15, n. 2 , p. 66-72.
- SUGIMURA M, HIROSE Y, HANAMOTO H, OKADA K, BOKU A, MORIMOTO Y, TAKI K, NIWA H. Influence of acute progressive hypoxia on cardiovascular variability in conscious spontaneously hypertensive rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 141, p. 94-103. 2008.
- SUN M, REIS D. Central mechanisms mediating excitation of sympathetic neurons by hypoxia. *Prog Neurobiol*, v. 44, p. 197-219. 1994.

- SUYLEN R, SMITS J, DAEMEN J. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotalina-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 157, p. 1423-1428. 1998.
- SWEENEY M, YUAN JX. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated potassium channels. *Respir Res*, v. 1, p. 40-48, 2000
- SZABO G, SOOS P, BAHRLER S, et al. Adaptation of the right ventricle to increased afterload in the chronically volume overload heart. *Ann Thorac*, v. 82, p. 989-995, 2006.
- 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.
- TESFAMARIAN B, OGLETREE M. Dissociation of endothelial cell dysfunction and blood pressure in SHR. *The American Physiology society*. v. 269, n. 38, p.189-194.
- THAMES M, GUPTA B, BALLON B. Central abnormality in baroreflex control of renal nerves in hypertension. *Am J Physiol*, v. 246, p. 843-50, 1984.
- TIMMERMANS P.B.M.W.M., WONG P.C., CHIU A.T., HERBIN W.F., BENFIELD P., CARINI D.J., LEE R.J., WEXLER R.R., SAYE J.A.M., SMITH R.D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251, 1993.
- 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.
- VELEZ S, CIARKA A, NAJEN B, VACHIERY J, NAEIJE R, BORNE P. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. *Circulation*, v. 110, p. 1308-1312. 2004.

- VON BOHLEN UND HALBACH O., WALTHER T., et al. Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *Journal of neurophysiology*, v. 83, p. 2012-20, 2000.
- WAKI H, GOURAUD S, MAEDA M, PATON J. Specific inflammatory condition in nucleus tractus solitarii of the SHR: Novel insight for neurogenic hypertension?. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v. 142, p. 25-31. 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.
- WRIGHT JW, HARDING JW. Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Research Rev* v.17, p. 227-262, 1992.
- YAJIMA M, UI M. Hypoglycemia induced by α -adrenergic stimulation during alkalosis. *Eur J Pharmacol*, v. 41, p. 93-102, 1977.
- 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.
- ZHANG C. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J Cardiol*, v. 26, n. 2, p. 316-324, 2010.

ZINI S, FOURNIE-ZALUSKI MC, CHAUVEL E, et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci, USA*, v.93, p. 11968-73, 1996.

ZINI S, FOURNIE-ZALUSKI MC, CHAUVEL E., et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 93, p. 11968-73, 1996.

ZOHN IE, SYMONS M, CHRZANOWSKA-WODNICKA M, WESTWICK JK, DER CJ Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Mol. Cell. Biol.* v. 18, p. 1225-35, 1998.

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. Esquistossomose
 - 1.4.6. Anemia hemolítica crônica
- 1.5. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
- 1.6. 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
-

APÊNDICE

APÊNDICE I

Registro de ondas atriais direita de animais Wistar (A) e SHR (B), onde: “a” representa a contração atrial, “c” representa o abaulamento da válvula átrio-ventricular provocado pelo ventrículo direito e “v” corresponde ao enchimento atrial.

