

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

Alexsandra Zimmer

**ANÁLISE TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E
PULMONARES NO MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR
INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Porto Alegre

2020

Alexsandra Zimmer

**ANÁLISE TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E
PULMONARES NO MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR
INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor(a) em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriane Belló-Klein

Porto Alegre

2020

BANCA EXAMINADORA:

DRA. ANA RAQUEL LUDKE – HEALTH CANADA/ GOVERNMENT OF CANADA

DRA. FERNANDA FERREIRA DA CRUZ- UFRJ

DRA. LUIZ CARLOS KUCHARSKI (RELATOR)- UFRGS

CIP - Catalogação na Publicação

Zimmer, Alexandra
ANÁLISE TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E
PULMONARES NO MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR
INDUZIDA POR MONOCROTALINA / Alexandra Zimmer. --
2020.
140 f.
Orientadora: Adriane Belló-Klein.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Hipertensão arterial pulmonar. 2. Monocrotalina.
3. Análise temporal. 4. Pulmão. 5. Coração. I.
Belló-Klein, Adriane, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **DEUS**, por ter me abençoado, iluminado e me dado forças para seguir em frente sempre. Obrigada por ser meu refúgio e abrigo nas horas difíceis e fonte de renovação nas horas de realização.

Aos meus pais, Juceli Maria Zimmer e Atanasio Zimmer, que sempre acreditaram em mim, e, que muitas vezes renunciaram seus próprios sonhos, para que eu conseguisse alcançar os meus. Gostaria que soubessem que essa conquista não é apenas minha, mas sim, nossa. Tudo que obtive foi graças ao amor, carinho e apoio que vocês sempre me deram. Obrigada por me ensinarem a valorizar as coisas simples da vida e a sempre agir com humildade, honestidade e amor ao próximo. Agradeço por terem reforçado a minha confiança, em inúmeros momentos, me aplaudindo de pé em cada nova etapa concluída. Amo muito vocês!

A **minha irmã Angélica Zimmer**, por sempre me incentivar e me ajudar quando era necessário. Obrigada por sempre estar torcendo para que eu alcançasse todos os meus objetivos. E mais do que isso, te agradeço pela nossa amizade e companheirismo incondicional de sempre.

Agradecimento especial **ao meu noivo, Rogian Bianchi Santini**, que durante todo o período do doutorado esteve do meu lado, me apoiando, incentivando e acreditando que tudo isso seria possível e que teria um significado único para minha vida. Obrigada, por mesmo nos meus momentos mais difíceis, estender a mão e sempre me apoiar. Por suportar a distancia, durante meu intercâmbio, pelas frases de motivação e esperança. Além disso, agradeço a paciência e compreensão que teve comigo durante meus períodos de estudo e de trabalho no laboratório. Obrigada também por conviver com meus milhares de artigos pela casa. Enfim, esses anos foram essenciais para reforçar que a nossa relação é solidificada no amor, respeito e companheirismo. Te amo muito!

A **minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Adriane Belló-Klein**, pela oportunidade que me destes ao abrir as portas do seu laboratório para mim. Sou imensamente grata por tê-la como orientadora de Mestrado e Doutorado. Agradeço por ter acreditado em mim, pela confiança, amizade, pelo retorno dos milhares de e-mails, e também pela paciência comigo. Agradeço também pelas trocas científicas e por todos os ensinamentos que me proporcionastes, incentivando a construção e o desenvolvimento do meu conhecimento. Ao longo desses anos,

a senhora se tornou, para mim, um exemplo de pessoa e de profissional. Assim como eu, tenho certeza que todos os que convivem contigo sabem o quanto amas ser professora e orientadora. Obrigada por transformar o laboratório um local acolhedor e, porque não dizer, familiar, uma vez que nós, alunos, sabemos que lá encontraremos apoio e palavras de sabedoria. Levarei com muito carinho todos os momentos vividos. Sou sua fã! Espero de coração, poder continuar sendo sempre sua amiga.

Aos demais **professores** do laboratório de Fisiologia cardiovascular e espécies reativas de oxigênio, **Dr. Alex Sander da Rosa Araujo, Dr. Alexandre Luz de Castro e Dr. Paulo Schenkel** pelas conversas científicas e contribuições feitas neste trabalho.

Aos **colegas** do laboratório de Fisiologia Cardiovascular e espécies reativas de oxigênio, por todas as trocas de experiência e crescimento profissional como grupo de pesquisa. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e, a prontidão para sempre auxiliarmos uns aos outros. Tenho orgulho de fazer parte deste time!

Agradecimento especial a minha colega de laboratório e amiga **Rayane Brinck Teixeira**, cujo convívio, apoio e amizade foram fundamentais para os frutos deste trabalho. Obrigada por compartilhar teus conhecimentos comigo e por me ensinar basicamente tudo que sei sobre laboratório.

Agradeço também a colega e amiga **Cristina Campos-Carraro** por todos os ensinamentos bioquímicos, pelo meu apelido carinhoso “Fashion” e por todos os momentos vividos no laboratório. Saibas que tenho muito carinho e apreço por ti.

Agradeço também a **Tânia Regina Gateli Fernandes-Piedras** pelos ensinamentos hemodinâmicos e por todo o suporte técnico prestado ao longo desses anos.

Agradecimento especial para minha **IC Rosalia Lempk Constantin**, que esteve sempre disposta a me ajudar e a aprender. Obrigada pelos momentos vividos, pela paciência, principalmente nas análises de western blot, e pela nossa amizade.

Aos professores **Dr. Guilherme Baldo e Dr^a. Fernanda Visioli** por todo o suporte e auxílio na realização das análises histológicas desta tese.

Ao **Esteban Gonzalez**, pela ajuda na realização das análises enzimáticas da elastase e colagenase.

A **professora Dr^a. Karina Rabello Casali** e a **aluna Catarina Scassola** pela parceria e realização da análise espectral.

Agradeço ao professor **Dr. Luciano Sturmer de Fraga**, pelo apoio técnico e pela prontidão em auxiliar na coleta de imagens da histologia durante o período de pandemia.

Ao **Dr. Pawan K. Singal**, por ter me recebido de braços abertos no seu laboratório, durante o meu intercâmbio no Canadá. Obrigada por todos os ensinamentos a mim prestados, pela oportunidade de ministrar uma palestra e também pela contribuição científica depositada neste trabalho.

Agradeço também ao **Ashim Bagchi**, colega e amigo do laboratório de Fisiopatologia Celular durante o meu intercâmbio no Canadá. Obrigada por me ensinar técnicas laboratoriais, como PCR e cultura de células e, por todas as trocas realizadas durante esse período.

Aos **meus amigos**, Francieli, Viviane, Rubiele, Thomás, Taiane e Matias que tiveram muita paciência e compreensão com a minha ausência, e que mesmo assim, sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade. É gratificante e confortante saber que sempre terei vocês com quem contar. Vocês não deixaram que eu desanimasse, nem desistisse. Obrigada pelas palavras de força, coragem e carinho. Os bons amigos conhecem todas as nossas histórias, enquanto vocês, **meus melhores amigos**, fazem parte dela.

Aos **meus sogros e cunhados**, por sempre me apoiarem e motivarem a continuar no meu caminho.

A **todos os meus demais familiares**, por sempre acreditarem e torcerem para que eu atingisse meus objetivos.

Ao **PPG Fisiologia**, pela oportunidade e por todo o suporte prestado.

Aos **órgãos de fomento**, CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro a este trabalho.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou que participaram da minha vida, meu mais sincero, OBRIGADA!

“Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade. Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível (Charles Chaplin).”

APRESENTAÇÃO

Esta tese é o resultado da pesquisa do: 1) papel da tioredoxina-1 (Trx-1) nas vias de sinalização celular (proliferação, apoptose e inflamação) envolvidas com o remodelamento vascular pulmonar observada na hipertensão arterial pulmonar (HAP); 2) papel do estresse oxidativo e nitrosativo pulmonar na progressão da HAP experimental e; 3) papel da inflamação, estresse oxidativo e do balanço autonômico no ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) ao longo da progressão da HAP experimental.

A tese está estruturada em nove capítulos, onde inicialmente se apresenta a introdução ao tema, que está organizada em três subitens de revisão bibliográfica que abordam a patologia, os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento e o modelo experimental para indução da doença em ratos, oriundos da literatura científica atual. Em seguida, são apresentadas a justificativa, as hipóteses e os objetivos (gerais e específicos para cada estudo). Os materiais e métodos, englobando todas as metodologias e os procedimentos realizados nos diferentes estudos que compõem esta tese, são exibidos no capítulo cinco. No capítulo seis, estão apresentados os resultados na forma de três artigos científicos.

O primeiro artigo exhibe os resultados do papel da Trx-1 nas vias de sinalização celular (proliferação, apoptose e inflamação) envolvidas no remodelamento vascular pulmonar observada na HAP. Além disso, o artigo evidencia parâmetros que confirmam a instalação da HAP, com aumento da resistência vascular pulmonar e do esforço miocárdico, além da deposição de colágeno no tecido cardíaco. Este trabalho é pioneiro, pois apresenta pela primeira vez o papel do sistema Trx-1, incluindo seu inibidor endógeno, na homeostase redox e na sinalização celular de processos como proliferação, apoptose e inflamação. O manuscrito está em análise na revista *Life Sciences* (Fator de impacto = 3.647).

O segundo artigo aponta os resultados do papel do estresse oxidativo e nitrosativo pulmonar na progressão da HAP induzida por monocrotalina (MCT). Também apresenta resultados do efeito da administração de MCT na disfunção endotelial pulmonar e na resposta da artéria pulmonar a vasoativos nos diferentes tempos de análises (1, 2 e 3 semanas). Este trabalho tem como inovação o estudo temporal das alterações induzidas pela MCT no leito pulmonar, considerando estresse oxidativo e nitrosativo, inflamação, disfunção endotelial e responsividade da artéria pulmonar, evidenciando as alterações em estágios precoces,

intermediários e avançados da doença. Este artigo está *in press* na revista *European Journal of Pharmacology* (fator de impacto=3.263), doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173699>.

O terceiro artigo denota os achados referentes ao efeito da administração intraperitoneal de MCT no VD e VE ao longo da progressão da HAP, levando em consideração a) estresse oxidativo, através da análise de espécies reativas, fontes dessas espécies, antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos e dano oxidativo a lipídios; b) presença de infiltrado inflamatório em ambos os ventrículos cardíacos, c) efeito da HAP na modulação autonômica cardíaca e d) resultados funcionais e morfométricos de ambos os ventrículos. Como inovação, este trabalho versa sobre dados referentes aos diferentes estágios da doença (1, 2, 3 e 4 semanas), em um ventrículo que é diretamente afetado pela doença e em um que não é diretamente afetado. Este artigo foi publicado na revista *Molecular and Cellular Biochemistry* (fator de impacto=2.795), doi: <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03652-2>, em janeiro de 2020.

Em seguida, no capítulo sete, apresenta-se uma discussão conclusiva, englobando os principais achados dos três artigos científicos, alicerçada pela literatura. O capítulo oito apresenta as conclusões deste trabalho de doutorado, enquanto no capítulo nove exhibe as principais perspectivas sobre o tema desta tese. Logo depois, encontram-se as referências bibliográficas dos textos científicos consultados para a redação dos capítulos Introdução, Material e Métodos e Discussão, enquanto as referências bibliográficas dos artigos científicos encontram-se apresentadas ao final de cada artigo.

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença progressiva e fatal, que promove um remodelamento vascular pulmonar obstrutivo, culminando no aumento da resistência vascular pulmonar (PVR) e da pressão arterial pulmonar média (mPAP). Como consequência, há sobrecarga de pressão para o VD que hipertrofia (HVD) e, em estágios avançados, desenvolve insuficiência cardíaca direita (ICD). A monocrotalina (MCT) corresponde ao principal modelo experimental de estudo da patologia e de novos alvos terapêuticos para a HAP. No entanto, poucos estudos focaram na análise da progressão da HAP induzida por MCT e seus efeitos em diferentes tecidos. Por isso, o objetivo desta tese foi avaliar a progressão da HAP induzida por MCT através da análise de parâmetros morfométricos, ecocardiográficos, hemodinâmicos, bioquímicos, moleculares e histológicos, a fim de caracterizar a evolução da doença em diferentes tecidos. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (número 32151). Ratos machos foram divididos em dois grupos: MCT e controle. O grupo MCT recebeu uma única injeção (60 mg / kg, i.p.) de MCT, enquanto o controle recebeu solução salina na mesma dose. Na sequência, os grupos MCT e controle foram divididos em 3 grupos: 1, 2, e 3 semanas (primeiro protocolo experimental) ou em 4 grupos: 1, 2, 3 e 4 semanas (segundo protocolo experimental). Para o primeiro protocolo experimental, as seguintes análises foram realizadas: ecocardiográfica (índice de *performance* miocárdica (MPI) e relação entre tempo de aceleração e tempo de ejeção pela artéria pulmonar (AT/ET), hemodinâmica (pressão arterial pulmonar média-mPAP) e morfométrica (hipertrofia do ventrículo direito-HVD). O pulmão foi usado para análises histológicas (determinação da espessura da parede pulmonar, extensão do dano tecidual, quantificação celular e deposição de colágeno), bioquímicas (atividade da NADPH oxidase –Nox, catalase –CAT, superóxido dismutase –SOD, glutathione peroxidase –GPx, tiorredoxina redutase –TrxR, glutathione redutase –GR e óxido nítrico sintase –NOS, concentração de sulfidril, espécies reativas de oxigênio total –ROS e TBARS), moleculares (expressão da eNOS, relação entre os receptores da endotelina-1 [ETAR e ETBR], expressão de Trx-1 e seu regulador VDUP-1- vitamina D (3) proteína regulada positivamente 1; fator nuclear 2 relacionado ao fator eritroide; proliferação celular [razão entre Akt total e fosforilada], vias de morte celular [caspase-3, razão entre JNK total e fosforilada e razão entre p38 total e fosforilada] e inflamação [razão entre NF- κ B 65 total e fosforilado, HSP70]) e imunohistoquímica (marcação com nitrotirosina). O segundo protocolo experimental consistiu na submissão dos animais ao exame ecocardiográfico (excursão sistólica do plano anular tricúspide (TAPSE), velocidade máxima de enchimento rápido e lento do ventrículo direito (relação E / A), mudança da área fracional do ventrículo esquerdo (FAC) e fração de ejeção ventricular (FE) e análise hemodinâmica (pressões sistólica e diastólica de VD e VE e suas derivadas de contratilidade e relaxamento), seguida de eutanásia. A modulação autonômica foi avaliada pela análise espectral considerando dois componentes espectrais: baixa frequência (LF) e alta frequência (HF). VD e VE foram usados, ainda, para análises morfométricas (HVD), bioquímicas (concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e TBARS, atividade da SOD, CAT, GPx e conteúdo de sulfidril) e histológicas (determinar o infiltrado inflamatório). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Os resultados com distribuição normal foram analisados pela ANOVA de duas vias,

complementada pelo teste de Student-Newman-Keuls, enquanto os resultados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). No pulmão, a HAP promoveu aumento nas atividades da Nox e SOD, aumento de ROS, expressão de eNOS e dano nitrosativo na primeira semana. Além disso, houve aumento da atividade de TrxR, da expressão de Trx-1 e VDUP-1, e redução da atividade da GR. Após duas semanas da administração de MCT, mostrou-se aumento da NOS e redução da atividade da CAT. Foi observada, também, redução da expressão da Trx-1, Nrf2 e HSP70, bem como aumento da expressão de VDUP-1 e das vias de proliferação, inflamação e apoptose. Na terceira semana, a HAP aumentou a atividade de SOD e NOS, diminuiu a expressão de eNOS e o conteúdo de sulfidrilas, aumentou a razão ETAR/ETBR, a concentração de ROS e do dano oxidativo (TBARS) e nitrosativo (nitrotirosina). Somado a isso, foi observado aumento da atividade de TrxR, redução da expressão de Trx-1, Nrf2 e HSP70, aumento da expressão de VDUP-1, ativação de proliferação celular e inflamação. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas vias apoptóticas. Todas essas alterações foram acompanhadas por remodelamento dos vasos pulmonares e extensa lesão no parênquima pulmonar. Além disso, deposição de colágeno foi encontrada em estágios avançados. Como consequência desse remodelamento pulmonar, houve aumento da mPAP e desenvolvimento de HVD após 2 e 3 semanas em comparação aos seus grupos controles. O desenvolvimento de HAP induziu redução da razão AT/ET e aumento do MPI na terceira semana. No tecido cardíaco, a indução com MCT promoveu aumento na pressão sistólica do VD, na concentração de H_2O_2 , atividade de CAT e TBARS, e diminuição do conteúdo de sulfidrilas no VD, associado à inflamação leve, enquanto no VE foi encontrado apenas aumento no conteúdo de sulfidrilas. Após duas semanas, houve, aumento da pressão sistólica do VD, conteúdo de sulfidrilas no VD, inflamação leve a moderada, HVD, enquanto no VE foi constatada inflamação leve e diminuição do conteúdo de sulfidrilas. Após três semanas, a HAP, no VD, levou à inflamação moderada a acentuada, diminuição da atividade da SOD e aumento da atividade da GPx e do dano oxidativo a lipídios. No VE, foi encontrado aumento de dano oxidativo e inflamação leve. Esta fase também foi caracterizada pelo aumento do tônus simpático e diminuição do tônus parassimpático. Dessa forma, no tecido pulmonar, a primeira semana foi marcada pela presença de estresse nitrosativo, que levou a uma adaptação após 2 semanas. O estresse oxidativo pulmonar foi evidente na terceira semana, provavelmente por um desequilíbrio entre os receptores da endotelina-1, resultando em remodelamento da matriz extracelular, disfunção endotelial e HVD. Assim, acredita-se que essas alterações no VD sejam decorrentes de alterações pulmonares anteriores. Aqui demonstramos essas alterações pulmonares através de um desequilíbrio na expressão das defesas antioxidantes, destacando uma redução na expressão de Trx-1 e um aumento no seu inibidor intrínseco, VDUP-1. Também demonstramos um envolvimento temporal das vias de sinalização relacionadas à proliferação e inflamação. No tecido cardíaco, é plausível supor que as mudanças observadas no estresse oxidativo e na inflamação estejam intimamente relacionadas às alterações iniciais induzidas pela HAP no VD, enquanto o desequilíbrio autonômico parece contribuir para a exacerbação dessa conversa cruzada nas fases avançadas da doença. Em contrapartida, devido à falta de efeito direto, o VE sofreu poucas alterações em resposta à administração da MCT.

Palavras chaves: análise temporal, MCT, estresse oxidativo/nitrosativo, disfunção endotelial, inflamação, disfunção autonômica, interdependência ventricular.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive and fatal disease that promotes an obstructive pulmonary vascular remodeling, culminating in an increase in pulmonary vascular resistance (PVR) and mean pulmonary arterial pressure (mPAP). As a consequence, there is pressure afterload for the right ventricle (RV), which hypertrophies (RVH) and, in advanced stages, develops right heart failure (RVF). Monocrotaline (MCT) corresponds to the main experimental model for studying pathology and new therapeutic targets for PAH. Few studies have focused on analyzing the progression of PAH induced by MCT and its effects on different tissues. Therefore, the objective of this thesis was to evaluate the progression of PAH induced by MCT through the analysis of morphometric, echocardiographic, hemodynamic, biochemical, molecular and histological parameters, in order to characterize the evolution of the disease in different tissues (lung, RV and left ventricle (LV), pulmonary artery). This study was approved by the UFRGS Research Ethics Committee (number 32151). Male rats were divided into two groups: MCT and control. The MCT group received a single injection (60 mg / kg, i.p.) of MCT, while the control received saline in the same dose. Then, the MCT and control groups were divided into 3 groups: 1, 2, and 3 weeks (first experimental protocol) or 4 groups: 1, 2, 3, and 4 weeks (according to the experimental protocol). For the first experimental protocol, the following analyzes were performed: echocardiography (myocardial performance index - MPI and relationship between acceleration time and ejection time through the pulmonary artery (AT/ET), hemodynamics (mPAP), and morphometry (RVH). Lung was used for histological analysis (determination of the thickness of the pulmonary wall, extent of tissue damage, cell quantification and collagen deposition), biochemical analysis (NADPH oxidase -Nox, catalase -CAT, superoxide dismutase -SOD, glutathione peroxidase -GPx activity, thioredoxin reductase - TrxR, glutathione reductase - GR and nitric oxide synthase -NOS, sulfhydryl concentration, reactive total oxygen species - ROS and TBARS), molecular (expression of eNOS, relationship between endothelin-1 receptors [ETAR and ETBR] , expression of Trx-1 and its regulator VDUP-1- vitamin D (3) positively regulated protein 1; nuclear factor 2 related to erythroid factor; cell proliferation [ratio between total and phosphorylated Akt] , cell death pathways [caspase-3, ratio between total and phosphorylated JNK and ratio between total and phosphorylated p38] and inflammation [ratio between total and phosphorylated NF- κ B 65, HSP70]) and immunohistochemistry (nitrotyrosine labeling). The second experimental protocol consisted of submitting the animals to echocardiographic examination (systolic excursion of the tricuspid annular plane (TAPSE), maximum speed of fast and slow filling of the RV (E/A ratio), alteration of the fractional area of the left ventricle (FAC) and ventricular ejection fraction (EF)) and hemodynamic analysis (systolic and diastolic pressures of RV and LV and their derivatives of contractility and relaxation), followed by euthanasia. Autonomic modulation was evaluated by spectral analysis considering two spectral components: low frequency (LF) and high frequency (HF). RV and LV were also used for morphometric (RVH), biochemical (hydrogen peroxide (H₂O₂) and TBARS, activity of SOD, CAT, GPx and sulfhydryl content) and histological analyzes (to determine the inflammatory infiltrate). The data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test. The results with normal distribution were analyzed by two-way ANOVA, complemented by the Student-Newman-Keuls test, while the results without normal distribution were analyzed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test (P<0.05). In the lung, PAH increased the activities of Nox and SOD, increased ROS, eNOS expression and nitrosative damage in the first week. In addition, there was an increase in TrxR activity, Trx-1 and VDUP-1 expression, and a decrease in GR activity. After two weeks of MCT administration, there was an increase in NOS and a reduction in CAT activity. It was also observed a reduction in the expression of Trx-1, Nrf2

and HSP70, as well as an increase in the expression of VDUP-1 and the proliferation, inflammation and apoptosis pathways. In the third week, HAP increased SOD and NOS activity, decreased eNOS expression and sulfhydryl content, increased the ETAR / ETBR ratio, the concentration of ROS and oxidative damage (TBARS) and nitrosative (nitrotyrosine). In addition, increased activity of TrxR, reduced expression of Trx-1, Nrf2 and HSP70, increased expression of VDUP-1, activation of cell proliferation and inflammation were observed. No significant differences were found in the apoptotic pathways. All of these changes were accompanied by remodeling of the pulmonary vessels and extensive injury to the lung parenchyma. In addition, collagen deposition has been found in advanced stages. As a consequence of this pulmonary remodeling, there was an increase in mPAP and development of RVH after 2 and 3 weeks compared to its control groups. The development of PAH induced a reduction in the AT/ET ratio and an increase in MPI in the third week. In cardiac tissue, induction with MCT promoted an increase in RV systolic pressure, H₂O₂ concentration, CAT and TBARS activity, and a decrease in the sulfhydryl content in the RV, associated with mild inflammation, whereas in the LV, only an increase in the content was found sulfhydryl. After two weeks, there was an increase in RV systolic pressure, content of sulfhydryl in RV, mild to moderate inflammation, RVH, while in LV there was mild inflammation and decreased content of sulfhydryl. After three weeks, PAH, in the RV, led to moderate to severe inflammation, decreased SOD activity and increased GPx activity and oxidative damage to lipids. In the LV, increased oxidative damage and mild inflammation were found. This phase was also characterized by an increase in sympathetic tone and a decrease in parasympathetic tone. Thus, in the lung tissue, the first week was marked by the presence of nitrosative stress, which led to an adaptation after 2 weeks. Oxidative pulmonary stress was evident in the third week, probably due to an imbalance between endothelin-1 receptors, resulting in remodeling of the extracellular matrix, endothelial dysfunction and RVH. Thus, it is believed that these changes in the RV are due to previous pulmonary changes. Here we demonstrate these pulmonary changes through an imbalance in the expression of antioxidant defenses, highlighting a reduction in the expression of Trx-1 and an increase in its intrinsic inhibitor, VDUP-1. We also demonstrated a temporal involvement of the signaling pathways related to proliferation and inflammation. In cardiac tissue, it is plausible to assume that the changes observed in oxidative stress and inflammation are closely related to the initial changes induced by PAH in the RV, while the autonomic imbalance seems to contribute to the exacerbation of this cross-talk in the advanced stages of the disease. On the other hand, due to the lack of direct effect, the LV underwent few changes in response to the administration of MCT.

Key-words: temporal analysis, MCT, oxidative / nitrosative stress, endothelial dysfunction, inflammation, autonomic dysfunction, ventricular interdependence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupos de HP, conforme divisão estabelecida no 6º Simpósio Mundial de HP

Figura 2 – Alvos moleculares de terapias disponíveis para HAP

Figura 3 – Sequência de eventos do remodelamento vascular pulmonar na HAP

Figura 4 – Sequência de eventos cardíacos que acometem o VD e VE

Figura 5 – Representação do processo de biossíntese do NO

Figura 6 – Efeitos da ligação da ET-1 com seus receptores em diferentes células

Figura 7 – Representação esquemática da geração de ROS

Figura 8 – Principais fontes de espécies reativas na HAP

Figura 9 – Desacoplamento da NOS

Figura 10 – Os principais sistemas de redução celular: Trx e GR

Figura 11 – O gênero e as espécies que mais produzem MCT

Figura 12 – Modelo de HAP induzida por MCT

Figura 13 – (A) Grupos experimentais e (B) protocolo experimental com duração de três semanas

Figura 14 – (A) Grupos experimentais e (B) protocolo experimental com duração de quatro semanas

Figura 15 – (A) Rato anestesiado e cateterizado e (B) equipamento utilizado para registro hemodinâmico

Figura 16 – Foto do banho de órgãos utilizado para realizar a reatividade vascular na artéria pulmonar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros hemodinâmicos utilizados para diagnóstico de HP

Tabela 2 – Principais estudos epidemiológicos mundiais de HAP

Tabela 3 – Instalação da HAP induzida pelo modelo de MCT

Tabela 4 – Alterações pulmonares induzidas pela administração de MCT

Tabela 5 – Alterações cardíacas induzidas pela administração de MCT

LISTA DE ABREVIATURAS

+dP/dt – derivada de contratilidade

5-HT – serotonina

Ach – acetilcolina

ADMA – dimetilarginina assimétrica

Akt – proteína cinase B

AMPc – monofosfato cíclico de adenosina

AP – artéria pulmonar

ARE – antagonista do receptor de endotelina

Art – artéria

AT/ET – tempo de aceleração pelo tempo de ejeção através da artéria pulmonar

BCC – bloqueadores dos canais de cálcio

BH₄ – tetrahydrobiopterina

Cam – calmodulina

CAT – catalase

CTR – controle

CTR 1w – grupo controle uma semana

CTR 2w – grupo controle duas semanas

CTR 3w – grupo controle três semanas

CTR 4w – grupo controle quatro semanas

DDAH₂ – dimetilarginina dimetilaminohidrolase

DMCT – dehidromonocrotalina

DNA – ácido desoxirribonucleico

-dP/dt – derivada de relaxamento

E/A – velocidade de enchimento rápido e lento pelo ventrículo direito

EF – fração de ejeção

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ET-1 – endotelina-1

ETAR – receptor da endotelina A

ETBR – receptor da endotelina B

FAC – mudança da área fracional

FC – frequência cardíaca

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMP – monofosfato de guanosina

GMPc – monofosfato cíclico de guanosina

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione

GSSG – glutathione oxidada

GTP – trifosfato de guanosina

HAP – hipertensão arterial pulmonar

HAPI – hipertensão arterial pulmonar idiopática

HE – hematoxilina e eosina

HF – banda de alta frequência/ parassimpático

HP – hipertensão pulmonar

HSP70 – proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons

HVD – hipertrofia ventricular direita

i.p. – intraperitoneal

ICD – insuficiência cardíaca direita

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IP – receptor da prostaciclina

JNK – quinase c-Jun N-terminal

LF – banda de baixa frequência/ simpático

MCT – monocrotalina

MCT 1w – grupo monocrotalina uma semana

MCT 2w – grupo monocrotalina duas semanas

MCT 3w – grupo monocrotalina três semanas

MCT 4w – grupo monocrotalina quatro semanas

MEC – matriz extracelular

mPAP – pressão arterial pulmonar média

MPI – índice de *performance* do miocárdio

N₂O₃ – óxido nitroso

NAD – dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NF-κβ – fator nuclear kappa β

NI – não informado

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NO₂⁻ – nitritos

NO₃⁻ – nitratos

NOS – óxido nítrico sintase

Nrf2 – fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2

ONOO⁻ – peroxinitrito

p38 – p38 MAP-quinase

PDE5 – fosfodiesterase do tipo 5

PDVD – pressão diastólica do VD

PDVE – pressão diastólica do VE

PGI₂ – prostaglandina I₂

Phe – fenilefrina

PSD – densidade da potência espectral

PSVD – pressão sistólica do VD

PSVE – pressão sistólica do VE

PVR – resistência vascular pulmonar

RNS – espécies reativas de nitrogênio

RO[•] – radical alcoxila

ROO[•] – radical peroxila

ROS – espécies reativas de oxigênio

SNA – sistema nervoso autônomo

SNP – sistema nervoso parassimpático

SNS – sistema nervoso simpático

SOD – superóxido dismutase

SOD-2 – superóxido dismutase mitocondrial

TAPSE – excursão sistólica do plano anular da tricúspide

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Trx – tioredoxina

Trx-1 – tioredoxina 1

Trx-2 – tioredoxina 2

Trx-3 – tioredoxina 3

TrxR – tioredoxina redutase

TXA₂ – tromboxano A₂

Txnip – proteína de interação da tioredoxina

VD – ventrículo direito

VDUP-1 – vitamina D3-proteína-1 regulada positivamente

VE – ventrículo esquerdo

WT – espessura da parede medial

XO – xantina oxidase

LISTA DE SIGLAS

COMPERA – Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CREAL – Centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HOPE – Hellenic pulmOnary hyPertension rEgistry

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

KORPAH – Korean Registry of Pulmonary Arterial Hypertension

NIH-US – National Institute of Health United States

NZ – Nova Zelândia

REVEAL – Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR	26
1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR	28
1.2.1. Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar	33
1.2.1.1. Remodelamento vascular pulmonar	34
1.2.1.2. Remodelamento do ventrículo direito	37
1.2.1.3. Remodelamento do ventrículo esquerdo	40
1.2.2 Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar	42
1.2.2.1 Disfunção endotelial	42
1.2.2.1.1 Papel do NO	43
1.2.2.1.2 Papel da ET-1	44
1.2.2.2 Estresse oxidativo e nitrosativo	46
1.2.2.3 Disfunção autonômica	52
1.2.3. Modelo de hipertensão arterial pulmonar induzido por monocrotalina	54
2 JUSTIFICATIVA	59
3 HIPÓTESE	60
3.1 ARTIGO 1: Vias de sinalização envolvidas na remodelação pulmonar durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar experimental.	60
3.2 ARTIGO 2: O papel do estresse oxidativo e nitrosativo pulmonar e comprometimento da reatividade da artéria pulmonar na progressão da HAP induzida pela MCT.	60
3.3 ARTIGO 3: Papel da inflamação, estresse oxidativo e ativação do sistema nervoso autônomo durante o desenvolvimento do remodelamento cardíaco direito e esquerdo na hipertensão arterial pulmonar experimental.	60
4 OBJETIVO GERAL:	61
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	61
4.1.1 Artigo 1: Vias de sinalização envolvidas na remodelação pulmonar durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar experimental.	61
4.1.2 Artigo 2: A progressão da hipertensão arterial pulmonar induzida pela monocrotalina é caracterizada por estresse oxidativo e nitrosativo pulmonar e comprometimento da reatividade da artéria pulmonar.	62
4.1.3 Artigo 3: Papel da inflamação, estresse oxidativo e ativação do sistema nervoso autônomo durante o desenvolvimento da remodelação cardíaca direita e esquerda na hipertensão arterial pulmonar experimental.	63
5 MATERIAIS E MÉTODOS	64
5.1 BIOÉTICA COM OS ANIMAIS	64
5.2 ANIMAIS	65
5.3 CÁLCULO AMOSTRAL	65

5.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	66
5.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	67
5.5.1 Indução de HAP através da administração de monocrotalina	69
5.6 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS:	69
5.6.1 Análises ecocardiográficas	69
5.6.2 Análises hemodinâmicas	71
5.6.3 Análise espectral	72
5.6.4 Reatividade vascular:	72
5.6.5 Análises morfométricas:	73
5.6.6 Análises Bioquímicas	75
5.6.6.1 Preparação de tecidos:	75
5.6.6.1.1 Quantificação de proteínas	75
5.6.6.1.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)	75
5.6.6.1.3 Atividade da enzima catalase (CAT)	76
5.6.6.1.4 Atividade da enzima glutationala peroxidase (GPx)	76
5.6.6.1.5 Atividade da glutationala redutase (GR)	77
5.6.6.1.6 Atividade de tiorredoxina redutase (TRxR)	77
5.6.6.1.7 Atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS)	77
5.6.6.1.8 Concentração de sulfidrilas	78
5.6.6.1.9 Atividade da NADPH Oxidase	78
5.6.6.1.10 Concentração total de espécies reativas de oxigênio (ROS)	78
5.6.6.1.11 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	79
5.6.6.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂):	79
5.6.6.3 Atividade da colagenase	79
5.6.6.4 Atividade da elastase	80
5.6.7 Análises moleculares:	80
5.6.8 Análises histológicas:	81
5.6.9 Análises imuno-histoquímicas:	82
5.7 CUIDADOS COM RELAÇÃO AO DESCARTE DE AMOSTRAS E MATERIAIS TÓXICOS	83
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
6 RESULTADOS	85
6.1 CAPÍTULO 1	86
6.2 CAPÍTULO 2	89
6.3 CAPÍTULO 3	90
7 DISCUSSÃO	91
7.1 MODELO DE MCT COMO INDUTOR DA HAP E ICD	91
7.2 ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MCT NO LEITO PULMONAR:	99
7.3 ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MCT NO TECIDO CARDÍACO	113

8 CONCLUSÃO	120
9 PERSPECTIVAS	121
REFERÊNCIAS:	122
ANEXO 1 CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	140

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença progressiva, que induz um remodelamento vascular pulmonar irreversível, responsável pela obstrução gradativa do lúmen, e conseqüentemente, pelo aumento da resistência vascular pulmonar (PVR) e da pressão arterial pulmonar média (mPAP). Todas essas modificações pulmonares geram aumento na pós-carga ao lado direito do coração, que, em estágios mais avançados, podem induzir insuficiência cardíaca direita (ICD) e morte (LAN et al., 2018; LAU et al., 2017). Clinicamente, a HP é diagnosticada quando a mPAP for ≥ 20 mmHg, por meio do cateterismo do ventrículo direito (VD) (SIMONNEAU et al., 2019). Posteriormente, os pacientes são subclassificados de acordo com a pressão capilar pulmonar e com a PVR, conforme apresentado na tabela 1 (CONDON et al., 2019; SAHAY, 2019; SIMONNEAU et al., 2019).

Tabela 1. Parâmetros hemodinâmicos utilizados para diagnóstico de HP.

Definição	Características
HP Pré-capilar	mPAP > 20 mmHg Pressão capilar pulmonar < 15 mmHg PVR ≥ 3 unidades Woods
HP pós-capilar isolada	mPAP > 20 mmHg Pressão capilar pulmonar > 15 mmHg PVR < 3 unidades Woods
HP pré e pós- capilar combinadas	mPAP > 20 mmHg Pressão capilar pulmonar > 15 mmHg PVR ≥ 3 unidades Woods

Fonte: adaptado e modificado de CONDON et al., 2019. HP: hipertensão pulmonar; mPAP: pressão média na artéria pulmonar; PVR: resistência vascular pulmonar; mmHg: milímetros de mercúrio.

A atual classificação da HP, conforme evidenciada na figura 1, é proveniente do 6º Simpósio Mundial de HP, ocorrido em 2018, dividindo-a em cinco grupos que compartilham semelhanças na sua etiologia, prognóstico e tratamentos (SIMONNEAU et al., 2019). O grupo 1, hipertensão arterial pulmonar (HAP), corresponde a um grupo de doenças que apresentam mudanças patológicas similares na vasculatura pulmonar, enquanto que os demais grupos correspondem ao desenvolvimento de HP secundário a outras patologias. O grupo 2 de HP é secundário à doença cardíaca esquerda, como insuficiência cardíaca sistólica ou diastólica, doenças valvares do lado esquerdo e outras. Já o grupo 3 é devido a doenças relacionadas ao parênquima pulmonar ou hipóxia. A HP do grupo 4 é decorrente de hipertensão pulmonar tromboembólica crônica e outros processos obstrutivos pulmonares, enquanto o grupo 5 inclui doenças com mecanismos multifatoriais ou mecanismos pouco claros. Por mais que se saiba que a incidência e a prevalência diferem entre os cinco grupos da HP, sendo mais frequente nos grupos 2 e 3 e mais rara nos grupos 1 e 4 (SIMONNEAU et al., 2019), estima-se que a HP afeta 1% da população global, sendo sua prevalência crescente na população com mais de 65 anos (HOEPER et al., 2016).

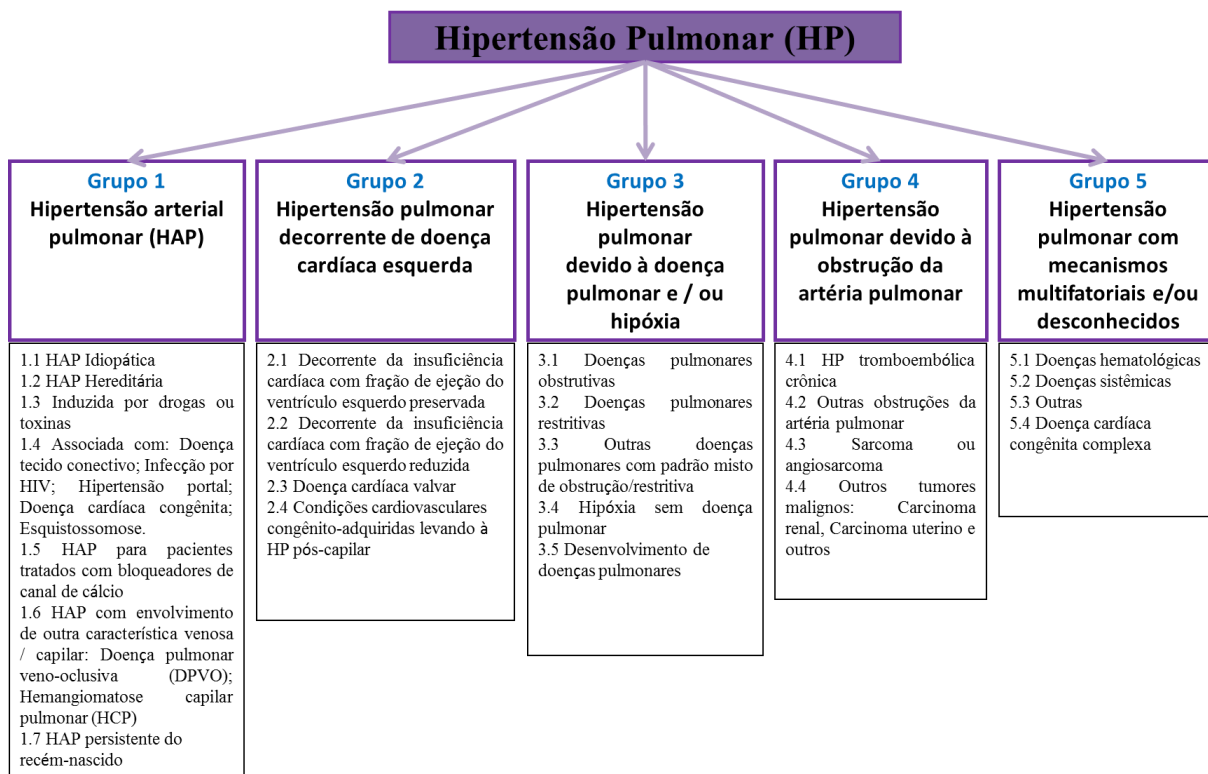


Figura 1 – Grupos de HP, conforme divisão estabelecida no 6º Simpósio Mundial de HP (adaptada de HOEPER et al., 2016).

1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

O grupo 1 da HP, que corresponde à HAP, pode ter várias etiologias, dentre as quais a idiopática (sem causa definida), em associação com doença de tecido conjuntivo, induzida por toxinas e drogas, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), esquistossomose, doença tromboembólica crônica ou forma hereditária (SIMONNEAU et al., 2019). A HAP é uma doença progressiva, que até os dias atuais não apresenta cura. Na clínica é diagnosticada através de um aumento anormal da mPAP (>20 mmHg) e da PVR (>3 unidades Woods), enquanto níveis normais de pressão capilar pulmonar (<15 mmHg) são observados (SAHAY, 2019).

Devido à ausência de dados documentados de doenças que são fatores de risco para HAP, como HIV e esquistossomose, ainda mais em países em desenvolvimento, onde se acredita que a carga global é muito maior do que aquela que se tem documentado, estudos apontam que a prevalência global de HAP é de 30 milhões de pessoas (SISNIEGA; ZAYAS; PULIDO, 2019). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que dentro do grupo 1 da HP, a HAP idiopática (HAPI) constitui a mais comum, respondendo por cerca de 30 a 50% de todos os casos (BADESCH et al., 2007; HUMBERT et al., 2006; THENAPPAN; RYAN; ARCHER, 2012). No entanto, mesmo sendo a mais comum entre o grupo 1, a HAPI é considerada uma doença rara com incidência estimada de 1,1 – 17,6 casos por milhão de adultos por ano, enquanto a prevalência corresponde a 4,6 – 50 casos por milhão de habitantes por ano (HOEPER et al., 2017; HUMBERT et al., 2006; LING et al., 2012; STRANGE et al., 2018). Em um estudo de coorte baseado na população de Ontário no Canadá, publicado em 2018, foi encontrado que tanto a incidência, quanto a prevalência de HAP aumentaram entre o período de 2003 a 2012 (THIWANKA WIJERATNE et al., 2018). No Brasil, ainda não existem dados publicados que caracterizam a população total acometida pela doença (LAPA et al., 2006). No entanto, um estudo epidemiológico evidenciou que a média de idade de pacientes diagnosticados com HAP foi de 46 anos, apresentando taxa de sobrevivência de 74% em três anos (ALVES et al., 2015).

A HAP é uma doença incapacitante, que apresenta sintomas insidiosos, o que consiste em um dos principais fatores associados ao diagnóstico tardio, que varia de 18 a 32 meses desde o tempo do estabelecimento até o diagnóstico de HAP (BROWN et al., 2011) e continua sendo uma das principais barreiras contra o sucesso no tratamento precoce desses

pacientes. Enquanto dispneia tem sido o sintoma mais relatado em diferentes registros epidemiológicos no mundo, síncope, fadiga, edema, ascite e distensão abdominal normalmente aparecem quando há prejuízo pulmonar e cardíaco e sugerem a presença de ICD (LAI et al., 2014; SWETZ et al., 2012). Esses sintomas e o alto risco de morte são atribuídos ao aumento da PVR e à redução da complacência vascular, resultando em alterações morfológicas do VD, que progridem para ICD (VAN DE VEERDONK et al., 2011). Devido ao difícil diagnóstico, que requer investigações invasivas e significativa experiência no cuidado com os pacientes, as diretrizes atuais recomendam que os pacientes sejam avaliados em centros especializados para diagnóstico e tratamento de doenças pulmonares (BARST et al., 2009; MCLAUGHLIN et al., 2009).

Na tabela 2 é possível visualizar a evolução da doença, considerando idade, gênero e taxa de mortalidade. Percebe-se, que a HAP acometia, geralmente, com maior severidade mulheres adultas (~36 anos). No entanto, estudos contemporâneos têm demonstrado que houve uma mudança nesse contexto, tendo em vista que o diagnóstico passou a ser feito na faixa etária acima dos 44 anos (BROWN et al., 2011). O motivo para esse aumento na idade média dos pacientes diagnosticados com HAP permanece desconhecido, mas se acredita que esse possa ser parcialmente explicado pelo uso de técnicas que permitiram a avaliação de uma população mais idosa, bem como possivelmente muitos pacientes tenham recebido diagnósticos errôneos antes do diagnóstico correto de HAP (HALPERN; TAICHMAN, 2009; HOEPER et al., 2013; JING et al., 2007). Outra característica da doença é que ela apresenta prevalência feminina (BADESCH et al., 2010; BROWN et al., 2011; MCGOON et al., 2013; RICH; BRUNDAGE, 1987). Isso se deve ao fato de que mulheres apresentam maior incidência de mutações do gene do receptor de proteína morfogenética óssea tipo II, presença de estresse nitrosativo, menopausa, e níveis reduzidos de dehidroepiandrosterona (BROWN et al., 2017; DUMAS DE LA ROQUE; SAVINEAU; BONNET, 2010; FODERARO; VENTETUOLO, 2016; MAIR et al., 2014; RAFIKOV et al., 2019; RUSIECKI et al., 2015). No entanto, mesmo que ser mulher represente um fator de risco para o desenvolvimento de HAP, homens estão associados com piores taxas de sobrevida, uma vez que apresentam menores níveis de estrogênio, níveis elevados de testosterona, reduzida reserva antioxidante, diferentes níveis de fatores derivados do endotélio e ainda, diferenças estruturais e funcionais do VD em relação às mulheres (JACOBS et al., 2014; LAHM et al., 2008; LAHM; KAWUT, 2017; LAHM; TUDER; PETRACHE, 2014; RYAN et al., 2015).

Ainda conforme a tabela 2 é possível notar que os primeiros registros epidemiológicos apresentavam taxas de mortalidade maiores (D'ALONZO et al., 1991) em relação aos estudos mais contemporâneos. Em outras palavras, a taxa de sobrevivência passou de 2,8 anos na década de 1980 para 6 anos nos dias atuais, o que pode ser devido ao desenvolvimento e uso de terapias mais específicas e melhor manuseio da ICD, bem como utilização aprimorada de métodos não invasivos para diagnóstico e acompanhamento da progressão da doença (THENAPPAN et al., 2010). No entanto, é importante enfatizar, que apesar desse avanço, a taxa de mortalidade após um ano ainda é considerada muito alta e indesejável (HOEPER et al., 2017) sendo associada principalmente ao desenvolvimento de ICD, ou em menor proporção à morte súbita ou a uma doença intercorrente pulmonar, para a qual a HAP predispõe piores desfechos (TONELLI et al., 2013).

Tabela 2: Principais estudos epidemiológicos mundiais de HAP.

REGISTRO	GRUPO	PERÍODO	Nº DE PACIENTES	IDADE – ANOS (MÉDIA ± DESVIO)	% GÊNERO FEMININO	% CLASSE FUNCIONAL III e IV	TAXA DE MORTALIDADE (%)		
							1 ANO	3 ANOS	5 ANOS
NIH-US	HAPI	1981 – 1985	187	36 ± 15	59	75	32	52	66
FRANCÊS	HAP	2002 – 2003	674	50 ± 15	65	75	17	45	42
CHINÊS	HAP	1999-2004	72	36 ± 12	71	NI	32	NI	79
GIESSEN	HAP	1993 – 2008	685	51 ± 16	65	81	NI	NI	NI
UK/IRLANDA	HAP	2001 – 2009	482	50 ± 17	70	80	7	27	40
REVEAL	HAP	2006 – 2009	2525	53 ± 14	83	74	9	26	43
COMPERA	HAPI	2007 – 2011	1278	71 ± 16	60	91	8	26	NI
KORPAH	HAPI	2008 – 2011	625	48 ± 16	80	49	9	16	NI
CANADÁ	HAP	1993 – 2012	7903	55 ± 28	60	NI	36	NI	62
BRASILEIRO	HAP	2008 – 2013	178	46 ± 15	77	46	7	26	NI
ALEMÃO	HAP	2014	1754	65 ± 16	62	NI	8	32	NI
COREANO	HAP	2008 – 2016	1307	44 ± 12	69	NI	15	46	54
AUSTRÁLIA / N.Z.	HAPI	2012 – 2016	220	57 ± 19	70	89	5	23	NI
HOPE	HAP	2015 – 2018	231	52 ± 19	65	41	NI	NI	NI

Classe funcional: determinada pela New York Heart functional class de cardiac failure; NIH – US: National Institutes of Health – United States; UK: United Kingdom; REVEAL: Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management; COMPERA: Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension; KORPAH: Korean Registry of Pulmonary Arterial Hypertension; N.Z: Nova Zelândia; HOPE: Hellenic pulmOnary hyPertension rEgistry; HAP: hipertensão arterial pulmonar; HAPI: hipertensão arterial pulmonary idiopática; Nº : número; NI: não informado.

A redução na taxa de mortalidade dos pacientes observada ao longo dos anos está intimamente relacionada com a disponibilidade e utilização de tratamentos. Cerca de 10% dos pacientes com HAP, apresentam efeitos benéficos do uso contínuo de bloqueadores dos canais de cálcio (BCC), alcançando uma sobrevida de 95% em cinco anos (GALIÈ et al., 2015; SITBON et al., 2005), enquanto que os demais pacientes (~90%), por não responderem ao tratamento com BCC, utilizam uma ou mais terapias direcionadas ao tratamento da HAP.

Atualmente, as terapias aprovadas podem ser administradas por diferentes vias (oral, inalatória, subcutânea e intravenosa), mas tem como alvo três vias de sinalização bem estabelecidas na doença, conforme mostrado na figura 2 (LAU et al., 2017).

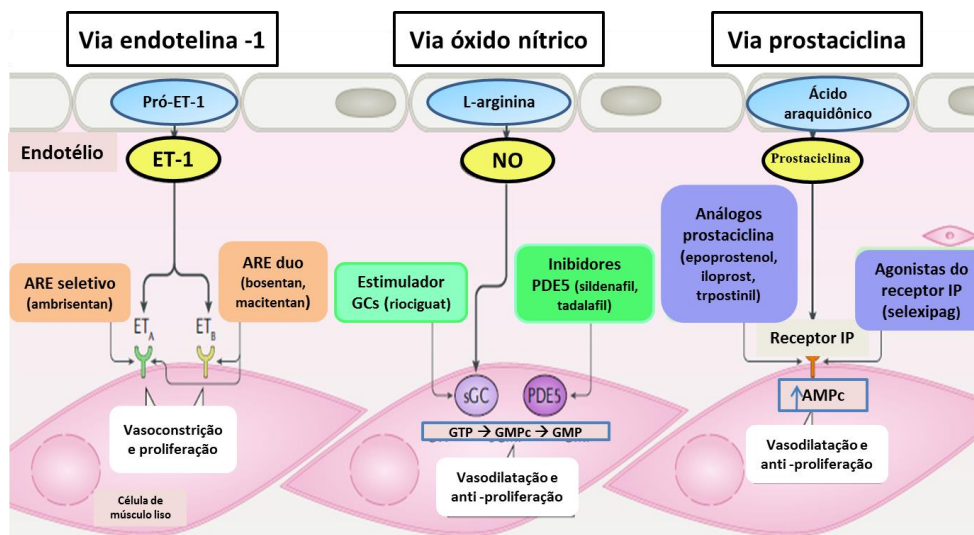


Figura 2 – Alvos moleculares de terapias disponíveis para HAP. ET-1: endotelina-1; ARE: antagonista dos receptores de endotelina; ETAR: receptor de endotelina A; ETBR: receptor de endotelina B; NO: óxido nítrico; GCs: guanilato ciclase solúvel; GTP: trifosfato de guanósina; GMPc: monofosfato cíclico de guanósina; GMP: monofosfato de guanósina; PDE5: fosfodiesterase tipo 5; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; IP: receptor da prostaciclina (adaptada de LAU et al., 2017).

A primeira via corresponde aos antagonistas dos receptores da endotelina-1 (ET-1) (ARE): bosentan e macitentan (antagonistas não seletivos do receptor de endotelina A [ETAR] / receptor de endotelina B [ETBR]) e ambrisentan (antagonista seletivo de ETAR) (KARAVOLIAS et al., 2010; PARIKH; BHARDWAJ; NAIR, 2019; PULIDO et al., 2013). A segunda via consiste na sinalização do óxido nítrico (NO), através da inibição da fosfodiesterase 5 (PDE5) (sildenafil, tadalafil e vardenafil) ou agonistas da guanilato ciclase solúvel (GCs) (GHOFRANI et al., 2013; JING et al., 2011; WEBB et al., 2015; WHITE et al., 2019; XU et al., 2009). A terceira via de sinalização envolvida no tratamento da HAP, por sua

vez, consiste na via da prostaciclina, incluindo os análogos prostanoídes epoprostenol, treprostinil, iloprost, bem como um agonista do receptor da prostaciclina (IP), selexipag (COGHLAN et al., 2018; MIHARA et al., 2018; OLSCHIEWSKI, 2009; PATEL; RAO; STRACHAN, 2018).

Por mais que essas terapias promovam a vasodilatação das arteríolas pulmonares, induzindo melhora no desempenho físico, na classe funcional, nos parâmetros hemodinâmicos, fica perceptível que os diferentes tratamentos utilizados atualmente em pacientes com HAP são incapazes de promover a cura da doença, além de terem seu uso limitado pelos efeitos colaterais (LAN et al., 2018; PARIKH; BHARDWAJ; NAIR, 2019; XU et al., 2009). Associado a isso, infelizmente, esses tratamentos apresentam pouco ou nenhum efeito direto sobre a função ventricular direita, uma vez que o tratamento ativo foi associado a efeitos vasodilatadores, predominantemente pulmonares e efeitos cardíacos específicos limitados (HANDOKO et al., 2010; VONK NOORDEGRAAF; GALIÈ, 2011).

1.2.1. Fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar

Em situação fisiológica, a circulação pulmonar apresenta baixa resistência, baixa pressão e alto fluxo sanguíneo, sendo a mPAP normal, em repouso, correspondente a $14 \pm 3,3$ mmHg e o limite superior máximo de 20,6 mmHg (KOVACS et al., 2009).

Para garantir que a circulação pulmonar seja mantida como um circuito de baixa pressão e alto fluxo sanguíneo, evitando a passagem de fluido para o espaço intersticial e permitindo que o VD opere em condições ideais (CHESTER; YACOUB, 2014), a regulação do tônus vascular na circulação pulmonar é um processo complexo e multifatorial que envolve a vasculatura pulmonar, a função do coração, a concentração de oxigênio no sangue e a capacidade do endotélio de liberar substâncias vasoativas. Para sustentar essa regulação equilibrada, as paredes vasculares pulmonares são mais finas e as camadas de músculo liso menos espessas, do que as da circulação sistêmica.

No entanto, as características básicas da circulação pulmonar acabam se perdendo com a instalação da HAP. As várias anormalidades histológicas e lesões vasculares encontradas na doença, descritas a seguir, são heterogêneas na sua distribuição, atingindo todas as camadas dos vasos. O remodelamento vascular pulmonar, característico da doença é conhecido como arteriopatia severa, que acomete, principalmente, vasos pulmonares arteriais distais e pequenas arteríolas pré-capilares (com diâmetro de 70 – 500 μm e 20 – 70 μm , respectivamente, em humanos), mas também uma variedade de veias pós-capilares e artérias brônquicas (TUDER et al., 2007).

1.2.1.1. Remodelamento vascular pulmonar

O remodelamento vascular pulmonar, como evidenciado na figura 3, é um processo multicelular e multifatorial, que promove alterações em processos como: crescimento, proliferação, migração e apoptose celular, além de produção e redistribuição de matriz extracelular (MEC) (AGGARWAL et al., 2013). Essas modificações são perceptíveis nos mais diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos (HUMBERT et al., 2019), como será explicado a seguir.

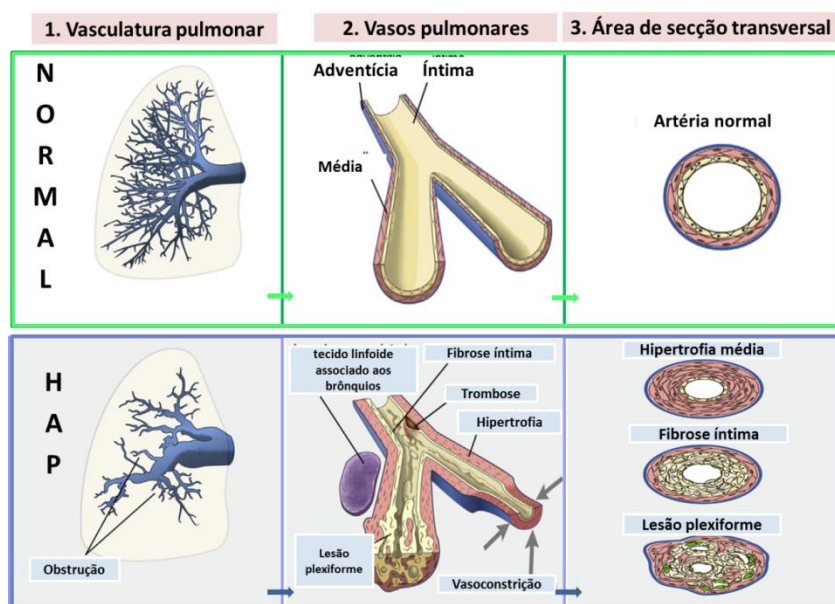


Figura 3 – Sequência de eventos do remodelamento vascular pulmonar na HAP (adaptado de Ryan et al., 2015).

O endotélio pode afetar o processo de remodelamento vascular e a PVR de várias formas. Acredita-se que um sinal inflamatório inicial (LIAO, 2013), promova uma resposta rápida através da menor biodisponibilidade de vasodilatadores (NO, prostaciclina e polipeptídeo intestinal vasoativo) e a superexpressão de substâncias vasoconstritoras (ET-1, tromboxano A₂ (TXA₂), serotonina (5-HT), entre outros) (BUDHIRAJA; TUDER; HASSOUN, 2004; VAILLANCOURT et al., 2015). Esse desequilíbrio, encontrado na HAP (BUDHIRAJA; TUDER; HASSOUN, 2004), estimula a constrição dos vasos e favorece o aumento da proliferação e resistência à apoptose de células vasculares nas artérias pulmonares distais (BOURGEOIS et al., 2018; WEDGWOOD et al., 2007). Além disso, a difusão de ET-1, 5-HT, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento em direção à túnica média (VAILLANCOURT et al., 2015; WEDGWOOD et al., 2007), promovem um aumento na espessura dessa camada e induzem o remodelamento da membrana basal (MATA-GREENWOOD et al., 2003).

A camada média dos vasos pulmonares passa por uma variedade de alterações na HAP, incluindo hiperplasia, hipertrofia e extensiva deposição de MEC (AGGARWAL et al., 2013). Esse remodelamento vascular pulmonar é causado por um processo ambíguo entre o excesso de proliferação e a resistência à apoptose das células musculares lisas (HUMBERT; SITBON; SIMONNEAU, 2004; LANDSBERG; YUAN, 2004). Na HAP, a hipertrofia da camada média é uma característica predominante de vasos proximais, enquanto pequenos vasos de resistência sofrem hiperplasia (MEYRICK; REID, 1979). Somado a isso, as células musculares lisas, produzem mais colágeno (tipo I e IV) e elastina, e adquirem um fenótipo sintético, considerado o oposto do fenótipo contrátil (FRID et al., 1997). Assim, o processo de muscularização de vasos não musculares é um resultado da diferenciação e da hipertrofia de células precursoras de células musculares lisas e pericitos presentes na parede dos vasos, além da migração e diferenciação de fibroblastos intersticiais (HIRSCH et al., 1996; JONES, 1992).

O remodelamento vascular pulmonar da camada adventícia, que acomete pacientes com HAP, pode estar associado a eventos como proliferação e diferenciação anormal de fibroblastos, aumento da deposição de MEC e inflamação crônica (HUMBERT et al., 2019). Na HAP, a ativação de fibroblastos resulta na produção de proteínas da MEC, incluindo colágeno, elastina, fibronectina e tenascina (KLINGBERG; HINZ; WHITE, 2013; LI et al., 2010). Além disso, fibroblastos podem modular o remodelamento vascular através da

regulação de diferentes parâmetros da camada média, incluindo conversão do fenótipo, proliferação, apoptose e migração (AGGARWAL et al., 2013; ZALEWSKI; SHI, 1997). Todas essas alterações induzidas pelos fibroblastos promovem e contribuem para o enrijecimento vascular (HUMBERT et al., 2019), que foi previamente associado à piora no prognóstico e indução da progressão da HAP (GAN et al., 2007; SUN; CHAN, 2018).

Outro importante contribuinte para a progressão da HAP é o processo inflamatório (HASSOUN et al., 2009; PRICE et al., 2012; SOON et al., 2010). Avaliações histológicas de tecido pulmonar de pacientes têm demonstrado a presença de infiltrado celular, composto de linfócitos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos (PERROS et al., 2007; TUDER et al., 2007), assim como níveis plasmáticos aumentados de componentes inflamatórios (HUMBERT et al., 1995; SOON et al., 2010). O envolvimento de componentes inflamatórios na HAP é tão relevante que algumas terapias anti-inflamatórias já foram propostas e apresentaram efeitos benéficos em modelos animais (PRICE et al., 2012; VOELKEL et al., 1994).

Nas fases finais da HAP, a proliferação monoclonal desorganizada de células endoteliais, migração e proliferação de células musculares lisas e acúmulo de células progenitoras e circulantes inflamatórios promovem a formação de lesões plexiformes (RICH et al., 2010; XU et al., 2007). Essas lesões que são encontradas em 15% dos pacientes representam um importante fator de risco para esses indivíduos. Em associação com o desenvolvimento de lesões plexiformes, existe a formação da camada neoíntima (uma camada de células e MEC entre o endotélio e a lâmina elástica interna) em estágios avançados da doença (YI et al., 2000). A formação da neoíntima, ativação plaquetária, coagulação intravascular contínua e o desenvolvimento de trombose *in situ* ocluem o lúmen vascular e contribuem para o aumento da PVR.

Ainda não se sabe exatamente quais são as vias de sinalização envolvidas nesse remodelamento vascular pulmonar encontrado na HAP. Porém, estudos vêm apontando para o envolvimento da via da proteína quinase B (Akt). A Akt pode desempenhar um papel fundamental na proliferação celular, uma vez que o uso de tratamentos que inibiram essa via resultaram na atenuação da doença (CAI et al., 2019; MA et al., 2017; SILVA et al., 2019). Um estudo evidenciou que utilizando um tratamento com propriedades inibitórias de proliferação e indução de apoptose de células tumorais, chamado formononetina, promoveu atenuação da HAP por meio da atenuação de vias como Akt e aumento de vias pró-

apoptóticas, reforçando o papel dessas vias nesta patologia (CAI et al., 2019). Melhora no remodelamento vascular pulmonar através da ingestão de cerveja fortificada com xanthohumol, foi relacionado à regulação negativa da expressão de proteínas como a Akt, após 4 semanas (SILVA et al., 2019).

Dessa forma, o remodelamento vascular pulmonar é considerado a base patológica da HAP e, uma vez instalado, reforça a consolidação da doença, onde a interrupção da mesma já é pouco provável (SAKAO; TATSUMI, 2011; SCHERMULY et al., 2011). Esse remodelamento vascular pulmonar na HAP induz: (a) enrijecimento e a redução da complacência vascular pulmonar, (b) obstrução e obliteração das artérias pulmonares devido à perda de volume vascular arterial, (c) indução da vasoconstrição, (d) fluxo sanguíneo restrito através dos vasos pulmonares e (e) aumento da PVR e da mPAP. Conseqüentemente, o aumento da pós-carga é direcionado para a parede fina do VD, que inicialmente hipertrofia, mas, com o passar do tempo leva ao declínio da função e do débito cardíaco e ao desenvolvimento de ICD (HUMBERT et al., 2019; LAI et al., 2014).

1.2.1.2. Remodelamento do ventrículo direito

Acoplado com o retorno venoso sistêmico de um lado e com a circulação pulmonar do outro, o VD apresenta formato decrescente ou de meia-lua e pode ser dividido anatomicamente em três porções: a entrada, o ápice trabeculado e a saída ou infundíbulo. Morfologicamente, o VD apresenta trabeculações uniformemente grosseiras, múltiplos músculos papilares, banda moderadora e uma valva átrio-ventricular com três folhetos. Sua parede livre é fina e normalmente apresenta 1 – 5 mm de espessura, sendo que funcionalmente o septo constitui a sua outra metade (KONSTAM et al., 2018). É caracterizado por apresentar cardiomiócitos dispostos longitudinalmente, com tamanho cerca de 15% menor do que os do ventrículo esquerdo (VE). O VD apresenta ainda uma maior resistência à isquemia do que o VE, devido ao seu menor tamanho (correspondente a 1/6 da massa do VE), menor carga de trabalho (cerca de 1/4 em comparação com a do VE), perfusão sanguínea contínua ao longo de todo o ciclo cardíaco (em razão da menor pressão intramiocárdica em relação à pressão aórtica) e maior concentração de enzimas glicolíticas anaeróbicas (maior reserva de oxigênio) (SANZ et al., 2019).

A ejeção normal de sangue do VD precede uma contração sincronizada peristáltica, começando nas regiões do seio e ápice em direção ao infundíbulo. Devido à presença de cardiomiócitos longitudinais, o encurtamento longitudinal representa aproximadamente 75% da contração ventricular direita. Somado a isso, parte da pressão desenvolvida pelo VD é proveniente da contração do septo interventricular (KLIMA; GUERRERO; VLAHAKES, 1998). Dessa forma, o desenvolvimento de pressão no VD é dependente da interação entre a parede livre do VD, o septo interventricular e a parede livre do VE e, ainda, a importância da função contrátil da parede livre do VD depende, em grande parte, da PVR e das pressões do VD (SANZ et al., 2019).

Atualmente, sabe-se que o papel do VD é sustentar um débito cardíaco eficiente para minimizar a variação do retorno venoso sistêmico para o coração (que pode sofrer variações de até 200%) e, dessa forma, não limitar o enchimento do VE (PINSKY, 2016). Sua parede mais fina torna o VD mais complacente e capaz de acomodar o aumento da pré-carga, mas incapaz de lidar com aumentos repentinos nas pressões da artéria pulmonar (SANZ et al., 2019).

O aumento da PVR e da mPAP, decorrentes do desenvolvimento de HAP, induzem aumento da pós-carga ao VD que, ao longo do tempo, sofrerá alterações, conforme resumido na figura 4. Inicialmente, o aumento da pós-carga promove aumento no trabalho cardíaco e na demanda de oxigênio. Como consequência, há aumento na contratilidade, desenvolvimento de hipertrofia cardíaca adaptativa concêntrica e manutenção do *status* funcional (RICH et al., 2010).

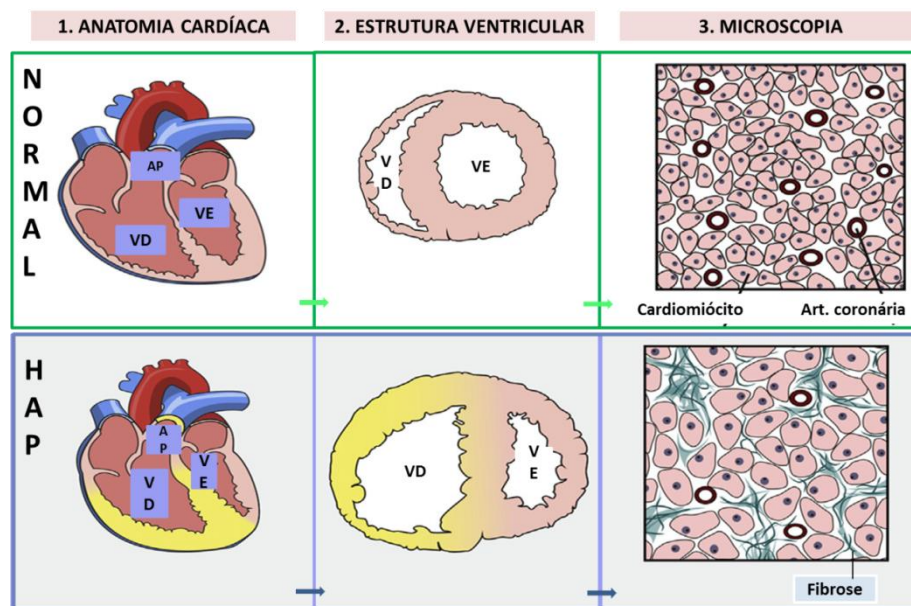


Figura 4 – Sequência de eventos cardíacos que acometem o VD e VE. HAP: hipertensão arterial pulmonar; AP: artéria pulmonar; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo. Art: artéria (adaptado de Ryan et al., 2015).

O aumento crônico da pós-carga para o VD, no entanto, induz continuamente um aumento do estresse de parede associado a um desequilíbrio na oferta e demanda de oxigênio, levando à ineficiência mecânica, diminuição da capacidade funcional, da fração de ejeção (EF) deste ventrículo (KLINGER, 2009) e ao aparecimento de sintomas como falta de ar. Conseqüentemente, com a progressão da doença, acredita-se que a hipertrofia torna-se mal adaptativa, através da substituição de cardiomiócitos por fibroblastos, alteração da MEC, prejuízos na vascularização, perda de contratilidade e dilatação excêntrica (RICH et al., 2010; RYAN; ARCHER, 2014). Nessa etapa, a forma do VD torna-se mais similar à do VE (figura 4). Ainda, há mudança no fluxo coronariano para o VD que passa a ser presente apenas na diástole, devido aos aumentos da pressão sistólica do VD e de sua massa muscular (KONSTAM et al., 2018; VAN DE VEERDONK et al., 2011). Nos casos mais severos de ICD, pode ocorrer morte súbita, devido ao enchimento inadequado do VE, resultando em perda de fluxo sanguíneo para o cérebro, o que é seguido de assistolia (JARDIN et al., 1987).

Atualmente, sabe-se que a ICD ou *Cor pulmonale* é a principal causa de morte em pacientes com HAP, e a capacidade do VD se adaptar ao aumento progressivo da PVR, associada com alterações na vasculatura pulmonar, são os principais determinantes da capacidade funcional e sobrevivência desses pacientes (HADDAD et al., 2008; LAI et al., 2014).

O diagnóstico clínico de remodelamento ventricular é baseado na sintomatologia e na detecção de alterações morfológicas, incluindo alterações no diâmetro da cavidade, massa (hipertrofia e atrofia), geometria (espessura e forma da parede de ambos ventrículos) e fibrose (COHN; FERRARI; SHARPE, 2000). Atualmente, o cateterismo do VD é considerado padrão-ouro para confirmação e diagnóstico de HAP; no entanto, por ser invasivo e pouco prático, tem-se utilizado cada vez mais os resultados provenientes da ecografia do VD, como parte da avaliação inicial do paciente em suspeita, na sua triagem e ainda durante o acompanhamento do mesmo (SAHAY, 2019). Isso se deve principalmente ao fato da ecografia ser uma técnica bem estabelecida, amplamente disponível, barata e segura. As diretrizes atuais recomendam a avaliação ecocardiográfica a cada 6 a 12 meses para pacientes estáveis e a cada 3 a 6 meses para aqueles que estão se deteriorando clinicamente ou têm mudanças na terapia (GALIÈ et al., 2015).

Importante destacar que, até o momento, os mecanismos que induzem a progressão da HVD adaptativa para a mal adaptativa e dilatação não estão bem definidos, mas acredita-se que se relacionem na ativação neuro-hormonal, estresse oxidativo e nitrosativo, ativação do sistema imune e apoptose (BOGAARD et al., 2009).

1.2.1.3. Remodelamento do ventrículo esquerdo

Embora a HAP sobrecarregue seletivamente o VD, adaptações neuro-hormonais globais e a interação ventricular mecânica podem desencadear alterações no VE. Em condições fisiológicas, o VE apresenta um formato concêntrico e paredes bem mais espessas do que o VD, sendo que a perfusão sanguínea do VE, diferentemente do VD, é limitada à diástole. O VE apresenta três camadas distintas de cardiomiócitos agregados e sua contração causa redução do volume por diminuição da área de secção transversal devida ao encurtamento das fibras circunferenciais e torção das fibras oblíquas com encurtamento axial longitudinal (GREYSON, 2010).

Na última década, a importância da interdependência ventricular foi demonstrada no cenário da HAP. A interdependência ventricular mecânica direta é uma consequência do arranjo anatômico dos ventrículos: o VE e o VD formam um contínuo, compartilham uma

parede septal, compartilham os cardiomiócitos circunferenciais epicárdicos e estão fechados dentro do pericárdio (SANZ et al., 2019). De fato, a sobrecarga crônica de pressão do VD distorce a geometria diastólica precoce do VE, atrasando a sua fase de enchimento, sendo que o comprometimento diastólico funcional do VE está intimamente relacionado aos níveis de HP. Em um estudo com 30 pacientes com *Cor pulmonale* crônico e HAP secundária a doenças pulmonares obstrutivas crônicas, foi constatado que a sobrecarga crônica da pressão do VD induziu o comprometimento do enchimento do VE, apesar de uma fase sistólica normal, devido ao desvio septal para a esquerda (SCHENA et al., 1996). Além de dados clínicos, essas alterações estruturais e outras (aumento de ET-1 e tenascina-C, prolongamento do potencial de ação, mudança da isoforma rápida para a lenta na cadeia pesada da miosina, manutenção da eficiência energética e associação entre a disfunção ventricular esquerda e o desequilíbrio do balanço redox) também foram encontradas em modelos experimentais da HAP (CORREIA-PINTO et al., 2009; HAN et al., 2018; HARDZIYENKA et al., 2012; LEICHSENRING-SILVA et al., 2011; LOURENÇO et al., 2006). Associado a isso, acredita-se que o VE acaba sofrendo alterações geométricas e funcionais, devido à compensação neuro-hormonal que ocorre em ambos os ventrículos. Ou seja, níveis elevados de fatores inotrópicos positivos (angiotensina II, ET-1 e noradrenalina) durante a HVD, afetarão as condições de carga do coração e podem contribuir para o processo de remodelamento cardíaco.

Embora alguns estudos tenham avaliado a função do VE e a sua interação com o VD em condições de sobrecarga, pouco se sabe sobre o efeito da interdependência ventricular ao longo da progressão da HAP, levando em consideração funções estruturais e funcionais. Dessa forma, estudar o VE, em animais que tenham sobrecarga de pressão do lado direito do coração devido à HAP pode ser muito útil para determinar as alterações dos sistemas neuroendócrinos e hemodinâmicos em si.

1.2.2 Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da hipertensão arterial pulmonar

1.2.2.1 Disfunção endotelial

Um mecanismo envolvido na fisiopatologia da HAP é a disfunção endotelial. Sabe-se que além de atuar como uma barreira semipermeável, o endotélio possui a capacidade de sintetizar e liberar moléculas vasoativas que interagem com os elementos sanguíneos e com o músculo liso vascular subjacente. Esses mediadores atuam na regulação do diâmetro do vaso pulmonar, induzindo vasodilatação ou vasoconstrição. Na realidade, em situações fisiológicas, existe um equilíbrio entre os mediadores para manter o tônus vascular pulmonar em um nível ideal (MORRELL et al., 2009). Aumentos ou diminuições nas quantidades de qualquer agente produzido ou alterações nos receptores / vias de sinalização que estimulam podem, portanto, alterar o equilíbrio em relação à vasodilatação ou vasoconstrição.

Na HAP, no entanto, há um desequilíbrio da síntese e secreção desses mediadores, em favor daqueles que promovem vasoconstrição, processo conhecido como disfunção endotelial. Como resultado há vasoconstrição sustentada, redução do raio interno e aumento significativo na PVR (HUMBERT et al., 2019). Cada vez mais, tem-se visto que alterações no metabolismo dessas substâncias vasoativas estão associadas com casos clínicos de pacientes com HAP (AGGARWAL et al., 2013; LAI et al., 2014). Redução nos mediadores de vasodilatação como a prostaglandina I₂ (PGI₂) já foi encontrada na HAP, e foi relacionada com maior produção de TXA₂ ou maior agregação plaquetária (CHRISTMAN et al., 1992). Em contrapartida, foi encontrado aumento na síntese de 5-HT pelas células endoteliais pulmonares, bem como sua maior atividade parácrina sobre células musculares lisas adjacentes (LAUNAY et al., 2002). Apesar disso, as substâncias vasoativas que mais têm ganhado destaque na patofisiologia da HAP são o NO e a ET-1.

1.2.2.1.1 Papel do NO

Dentre os vasodiladores sintetizados e secretados pelo endotélio, o NO é considerado o mais importante, uma vez que desempenha um papel relevante na fisiologia do pulmão, particularmente na manutenção de baixa pressão no circuito pulmonar normal. O NO é um gás inorgânico, radical livre, com meia vida muito curta e ampla capacidade de difusão pelas membranas plasmáticas devido a suas características lipofílicas. Em função da sua estrutura química, o elétron desemparelhado confere reatividade com outras moléculas, o que leva a inúmeros e diferentes efeitos fisiológicos e patológicos (HUYNH; CHIN-DUSTING, 2006; IGNARRO, 2010; MONCADA; HIGGS, 2006). O NO endógeno é formado a partir do aminoácido L-arginina, por meio de uma reação catalisada por uma família de enzimas, conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS), que incluem a isoforma neuronal (nNOS), a isoforma endotelial (eNOS) e a isoforma induzível (iNOS) (DIAS; CAU; TANUS-SANTOS, 2008). O processo de formação do NO é apresentado na figura 5. Em condições normais, a NOS recebe elétrons do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) no seu domínio redutase e os transfere para o domínio oxigenase, via transportadores redox flavina adenina dinucleotídeo e flavina mononucleotídeo. Uma vez no domínio oxigenase, os elétrons interagem com o ferro do grupo heme e com a tetrahydrobiopterina (BH₄), co-fator importante para catalisar a reação do oxigênio com a L-arginina, produzindo L-citrulina e NO (DOS SANTOS et al., 2010).

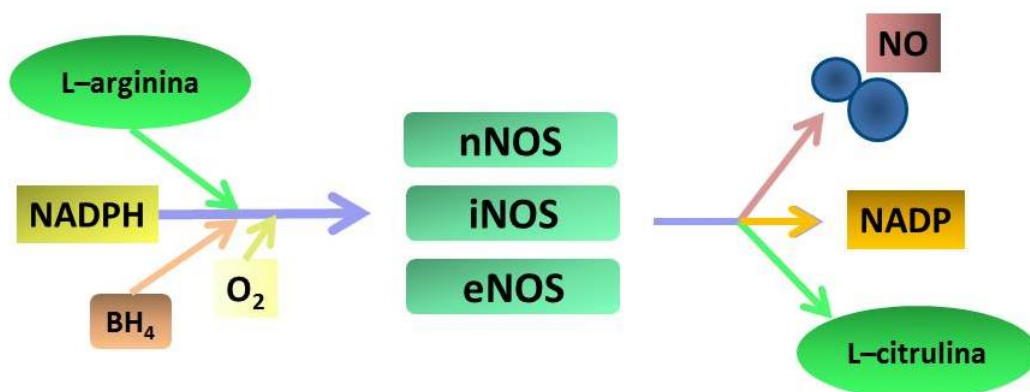


Figura 5 – Representação do processo de biossíntese do NO. NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; BH₄: tetrahydrobiopterina; O₂: oxigênio; nNOS: óxido nítrico sintase neuronal; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; NADP: dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (adaptada de DOS SANTOS et al., 2010).

Em humanos, a expressão da eNOS foi investigada, sendo encontrada pouca ou nenhuma expressão da enzima no endotélio vascular das artérias pulmonares com anormalidades histológicas graves (isto é, lesões plexiformes) em pacientes com HP (GIAID; SALEH, 1995). Alteração do metabolismo do NO também é encontrada em estudos pré-clínicos. A indução de HAP experimental promoveu redução significativa na expressão da eNOS, que foi relacionada com a proliferação e o vasoespasma de arteríolas pulmonares induzidos por disfunção endotelial (FUJI et al., 2016). Um estudo recente evidenciou o papel benéfico da terapia gênica em animais cujas células endoteliais super-expressavam a enzima eNOS, mostrando redução da elevação da pressão sistólica do ventrículo direito, da HVD, da muscularização arteriolar pulmonar e da perda de densidade alveolar nos animais tratados em comparação àqueles que não receberam esse tratamento (SOMANI et al., 2019).

1.2.2.1.2 Papel da ET-1

O endotélio é também uma fonte importante de fatores vasoconstritores. As endotelinas (1, 2 e 3) foram descobertas em 1988 e foram consideradas as substâncias vasoconstritoras mais potentes e de maior duração secretadas pelas células endoteliais vasculares aórticas de porcos (YANAGISAWA et al., 1988). Mesmo que a ET-1 seja sintetizada em células epiteliais, leucócitos, macrófagos, células musculares lisas, fibroblastos, cardiomiócitos e neurônios, a principal fonte da sua produção é nas células endoteliais (HORINOUCI et al., 2013; VAN GUILDER et al., 2007).

Todas as três endotelinas se ligam a dois tipos de receptores denominados ETAR e ETBR. No sistema cardiovascular, os receptores ETAR são encontrados nas células musculares lisas e nos cardiomiócitos cardíacos, enquanto os receptores ETBR estão localizados nas células endoteliais e nas células musculares lisas. Nos pulmões, os receptores ETAR predominam nas grandes artérias pulmonares humanas, enquanto os receptores ETBR predominam no músculo liso das vias aéreas e no tecido da parede alveolar. A figura 6 apresenta os diferentes efeitos da ET-1, através da sua interação com seus receptores. É conhecido que a ligação da ET-1 aos receptores ETAR e ETBR das células musculares lisas produz vasoconstrição, enquanto que a ativação dos receptores ETBR nas células endoteliais exerce duas ações principais: liberação de vasodilatadores (NO e PGI₂) e depuração de ET-1

da circulação nos pulmões e rins (BAGNALL et al., 2006; HORINOUCI et al., 2013; LUSCHER; BARTON, 2000). Ainda, nos fibroblastos, sistema imune e cardiomiócitos, a ET-1 promove respectivamente aumento da deposição de colágeno e fibrose, indução da agregação plaquetária, adesão e migração de células inflamatórias e promoção de inotropismo e hipertrofia ventricular (GALIÉ; MANES; BRANZI, 2004; HORINOUCI et al., 2013).

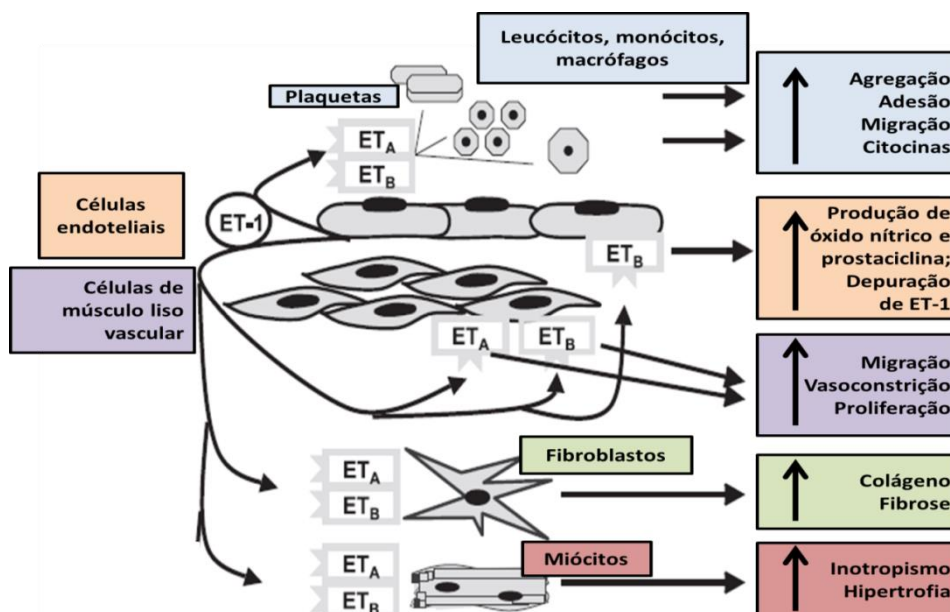


Figura 6 – Efeitos da ligação da ET-1 com seus receptores em diferentes células. ET-1: endotelina-1; ET_A=ETAR: receptor de endotelina A; ET_B=ETBR: receptor de endotelina B (adaptado de GALIÉ; MANES; BRANZI, 2004).

Há vários estudos que apontam para um papel no desequilíbrio na produção de ET-1 e seus receptores na HAP. Estudos clínicos e pré-clínicos têm evidenciado aumento nos níveis plasmáticos e teciduais de ET-1, além de correlação com diferentes desfechos clínicos (RAFIKOVA et al., 2013; STEWART et al., 1991; VIZZA et al., 2013). Como pacientes com HAP apresentam aumento na razão ETAR/ETBR nas células musculares lisas e no VD e redução do ETBR nas células endoteliais (KUC et al., 2014), tratamentos capazes de reverter essas condições são capazes de atenuar a severidade da doença, como demonstrado em estudos experimentais recentes (DE LIMA-SEOLIN et al., 2018; HSU et al., 2018; TÜRCK et al., 2020).

1.2.2.2 Estresse oxidativo e nitrosativo

Outro importante mecanismo envolvido na fisiopatologia da HAP corresponde a formação exacerbada de espécies reativas. A oxidação corresponde a um processo fundamental da vida aeróbia e do metabolismo celular, produzindo espécies reativas de forma natural ou devido a alguma disfunção biológica. As espécies reativas de oxigênio (ROS), conforme mostrado na figura 7, incluem os radicais livres, como: oxigênio singlete sigma, hidroxila (HO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet), alcóxila (RO^\bullet); e as espécies não-radicalares: oxigênio singlet delta, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso, entre outros. Uma das diferenças entre estas espécies é que os radicais livres possuem elétrons desemparelhados, enquanto as outras espécies não possuem (AGGARWAL et al., 2013; FULTON et al., 2017; LUSHCHAK, 2014; MIKHAEL et al., 2019).

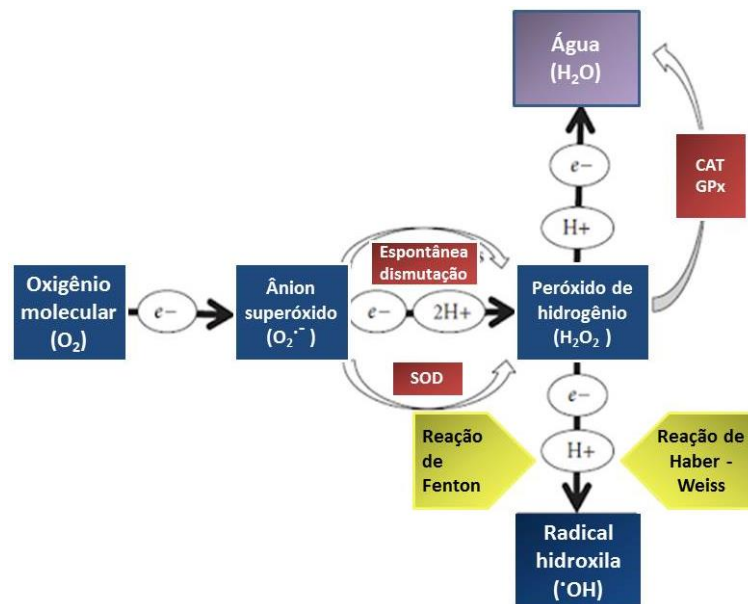


Figura 7 – Representação esquemática da geração de ROS. A redução monovalente gradual de O_2 leva à formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH^\bullet e H_2O . $\text{O}_2^{\bullet-}$ é facilmente dismutado em H_2O_2 por reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD). Enquanto H_2O_2 é posteriormente convertido em H_2O por ação da catalase (CAT) ou glutaciona peroxidase (GPx). e⁻: elétron; H⁺: hidrogênio, (adaptado SHARMA et al., 2012).

Já as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são produtos reativos derivados do NO, que incluem o óxido nítrico (N_2O_3), ácido nítrico (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitrito (ONOO^\bullet) e estão implicados na patogênese da HAP (HANSEN et al., 2016; TABIMA; FRIZZELL; GLADWIN, 2012).

Sabe-se que a síntese das espécies reativas pode ocorrer em todos os tipos celulares, incluindo células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos adventícios. Os mecanismos de geração de espécies reativas ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. A mitocôndria é a principal fonte geradora de espécies reativas, por meio da cadeia de transporte de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio. Outra importante fonte geradora são as enzimas NADPH oxidases, que são proteínas de membrana que têm a função de transferir elétrons através das membranas celulares. A figura 8 representa as principais fontes de espécies reativas envolvidas na HAP, incluindo disfunção mitocondrial, ao aumento da atividade da NADPH oxidase, da xantina oxidase (XO) e, ainda, pela eNOS desacoplada (AGGARWAL et al., 2013).

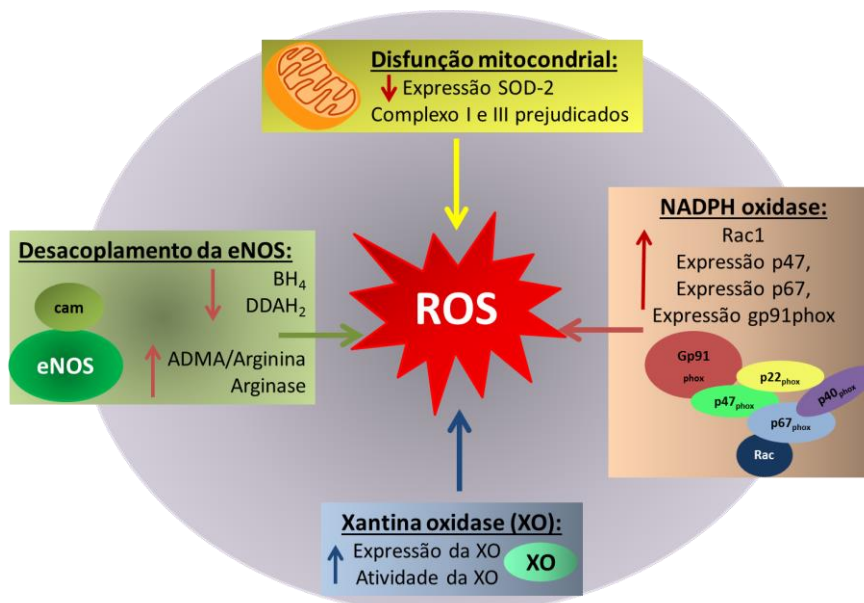


Figura 8 – Principais fontes de espécies reativas na HAP. ROS: espécies reativas de oxigênio; SOD-2: superóxido dismutase dependente de manganês (isoforma mitocondrial); eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; cam: camodulina; BH₄: tetrahydrobiopterina; DDAH₂: dimetilarginina dimetilaminohidrolase 2; ADMA: dimetilarginina assimétrica (adaptado de Aggarwal et al., 2013).

O desacoplamento da eNOS, apresentado na figura 9, corresponde a situações de depleção de substrato (L-arginina) / co-fator (BH₄) ou níveis elevados de espécies reativas, resultando em produção de O₂^{•-} e NO, que podem interagir e levar à formação de ONOO⁻ (HAMILTON; WATTS, 2013; GALOUGAHI et al., 2014). O ONOO⁻ oxida proteínas tióis formando dissulfeto e causa a nitração de grupos tirosil nas proteínas, resultando em proteínas nitradas, que também contribuem para a perda de função (KALYANARAMAN, 2013). Essas

alterações induzem ativação de moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição envolvidos com o processo de inflamação e remodelamento vascular e, conseqüentemente, participam da patofisiologia da HAP.

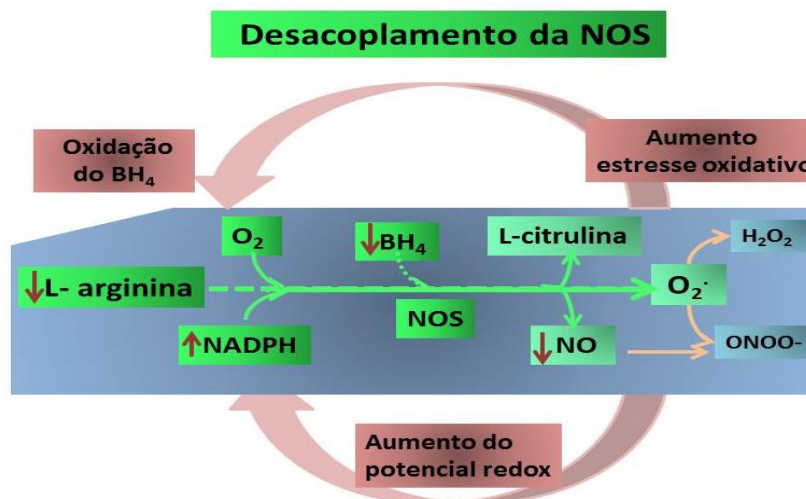


Figura 9 – Desacoplamento da NOS. BH₄: tetraidrobiopterina; O₂: oxigênio; NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina; NOS:óxido nítrico sintase; NO: óxido nítrico; O₂^{•-}: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; ONOO⁻: peroxinitrito, (adaptada de HAMILTON; WATTS, 2013).

Sabe-se que em concentrações fisiológicas, as espécies reativas estão envolvidas na regulação rotineira dos processos fisiológicos e celulares, onde desempenham um papel fisiológico no controle da função endotelial e medeiam a chamada sinalização redox, principalmente por meio da ação do H₂O₂. Dentre os principais mediadores de sinalização induzidos por essas espécies estão proteínas quinases como quinase c-Jun N-terminal (JNK), p-38 MAP-quinase (p38) e Akt (CIRCU; AW, 2010; UEDA et al., 2002). Como possuem reatividade e instabilidade, as espécies reativas interagem com outras moléculas biológicas e, quando em altas concentrações, podem exercer efeitos prejudiciais e irreversíveis a lipídios de membrana, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (GIORDANO, 2005). Além disso, a elevada concentração de espécies reativas apresenta um papel fisiopatológico nos processos subjacentes à HAP, como disfunção endotelial, hiperreatividade e remodelamento vascular (LAI et al., 2014; RABINOVITCH, 2012).

Dessa forma, para manter concentrações ideais de espécies reativas, bem como na tentativa de minimizar ou até mesmo inibir seus efeitos deletérios, o organismo possui um complexo e bastante eficiente sistema de defesa antioxidante. Este sistema é composto por

componentes enzimáticos e não-enzimáticos (HALLIWELL, 2006). Os componentes enzimáticos endógenos correspondem à primeira linha de defesa e incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx), e encontram-se apresentadas na figura 7. Após sua formação, o $O_2^{\bullet-}$ é dismutado pela SOD (extracelular, mitocondrial ou citosólica) para H_2O_2 e O_2 . A presença da enzima SOD permite a eliminação do $O_2^{\bullet-}$ mesmo em baixas concentrações (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O H_2O_2 resultante pode ser reduzido à água por ação da GPx ou da CAT (COX; WINTERBOURN; HAMPTON, 2010). A GPx catalisa a redução do H_2O_2 (isoforma selênio-dependente) e peróxidos orgânicos (isoforma não-selênio dependente) para seus correspondentes álcoois, às custas da conversão da glutational reduzida (GSH) à glutational oxidada (GSSG) (CIRCU; AW, 2010). Embora a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica e sua velocidade máxima de catálise ocorra em baixas concentrações de H_2O_2 , *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana. A CAT, por sua vez, é uma hemoproteína citoplasmática encontrada em grandes concentrações nos peroxissomas e em baixas concentrações nas mitocôndrias, induz a conversão de H_2O_2 à água, principalmente quando este se encontra em altas concentrações (POWERS; LENNON, 1999).

O sistema antioxidante não-enzimático inclui, dentre outros, a GSH e a tiorredoxina (Trx). A GSH tem amplo poder redutor devido a sua capacidade de doar prótons, combinada a sua alta concentração intracelular (AQUILANO; BALDELLI; CIRIOLO, 2014). Composta por aminoácidos (glutamato, cisteína e glicina), a GSH serve como doador de elétrons para a redução de peróxidos, reação catalisada pela enzima GPx, sendo convertida em GSSG. A reciclagem da glutational ocorre pela ação da glutational redutase (GR), que catalisa a conversão de GSSG a GSH, pela transferência de elétrons do NADPH, conforme mostrado na figura 10 (HALLIWELL, 2006).

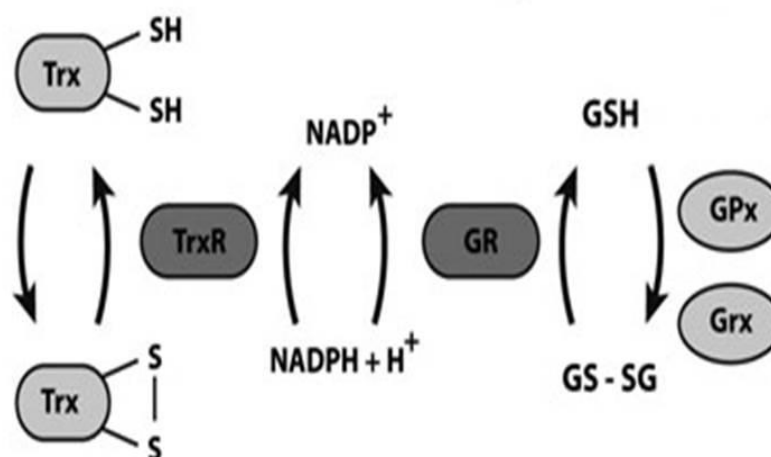


Figura 10 – Os principais sistemas de redução celular: Trx e GSH. A GSH oxidada (dissulfeto de glutatona, GSSG) é regenerada a sua forma reduzida pela glutatona redutase (GR) utilizando NADPH. A tiorredoxina redutase (TrxR) usa elétrons do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) para reduzir a Trx-1. GPx: glutatona peroxidase; Grx: glutarredoxina; H⁺: hidrogênio, (adaptado de CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015).

Assim como a GSH, a Trx tem merecido destaque por desempenhar importante ação na modulação do estado redox celular (LEE; KIM; LEE, 2013; MAHMOOD et al., 2013). As Trx são altamente conservadas em diferentes organismos, apresentando uma estrutura comum (quatro α -hélices e cinco folhas- β) que através de uma ligação entre a segunda folha- β e a segunda hélice- α tornam a proteína de pequeno tamanho bem compactada e globular. A Trx foi identificada em meados da década de 1960 e sua alta conservação entre os organismos reforça seu papel essencial na sobrevivência e função celular (LEE; KIM; LEE, 2013; MAHMOOD et al., 2013). Atualmente, tem-se o conhecimento de três isoformas da Trx: a Trx-1, localizada no citosol, mas pode ser translocada para o núcleo e ser passível de secreção para o ambiente extracelular em algumas situações; a Trx-2 localizada na mitocôndria e a Trx-3, expressa nos espermatozóides (MAHMOOD et al., 2013). As Trxs são chamadas oxirredutases, pois apresentam a capacidade de reduzir as ligações dissulfeto (S - S) das proteínas, deixando seus grupos tiol (-SH) livres, tendo como consequência desse processo, um dissulfeto no sítio ativo da Trx e um ditiol na proteína-alvo (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; MAHMOOD et al., 2013). No entanto, esse processo pode ser revertido com a ação das tiorredoxinas redutases (TrxR).

As TrxRs são enzimas dependentes de selênio, que usam o doador de elétrons NADPH para regenerar as isoformas da Trx, ou seja, para retornar ao seu estado reduzido. A Trx-1 deve ser reduzida de volta pela TrxR dependente de NADPH, como evidenciado na figura 10 (ARNÉR; HOLMGREN, 2000; MAHMOOD et al., 2013).

Além desse fator, a capacidade da Trx pode ser modulada pelo seu inibidor endógeno, conhecido como vitamina D3-proteína-1 regulada positivamente (VDUP-1 – em animais) ou proteína de interação da tiorredoxina (Txnip – em humanos) (CHUNG et al., 2006). A VDUP-1 é uma proteína de 50 kDa que, através da sua interação com o sítio catalítico da Trx, promove inibição da mesma. Atualmente, a VDUP-1 é considerada o único inibidor endógeno das Trxs (CHUNG et al., 2006; MAHMOOD et al., 2013). É importante destacar que a interação entre VDUP-1 e Trx-1 somente ocorre quando esta última encontra-se em seu estado reduzido, podendo dessa forma, modular o estado redox celular, induzir o estresse oxidativo e promover a apoptose (JUNN et al., 2000; MAHMOOD et al., 2013; NISHIYAMA et al., 2001; YOSHIHARA et al., 2013).

Por mais que o papel fundamental da Trx-1, em geral, seja associado à manutenção de um ambiente redutor e de proteção da célula dos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, a Trx-1 tem sido associada a outras funções, como por exemplo, serve como cofator de enzimas essenciais para produção de precursores de DNA (HOLMGREN, 1989); fora da célula, apresenta função de sinalizadora para crescimento celular e fator quimiotático (MAHMOOD et al., 2013; WAKASUGI et al., 1987); no núcleo é responsável por regular fatores de transcrição, tais como fator nuclear *kappa* beta (NF- κ B) (SCHENK et al., 1994).

Como citado previamente, processos fisiológicos essenciais, incluindo proliferação e morte celular são modulados por alterações no balanço redox e sabendo que a Trx-1 apresenta papel crucial na manutenção desse balanço, alguns estudos tem relacionado o envolvimento de alterações na Trx-1 com o desenvolvimento da HAP. No modelo de HAP experimental, foi relatada redução na expressão de Trx-1 no VD de ratas (SIQUEIRA et al., 2018) ou não alteração na expressão no VD de ratos (MOSELE et al., 2012) após três semanas, ou ainda aumento da atividade da TrxR após 31 dias no VE de ratos (LEICHSENRING-SILVA et al., 2011). De uma forma geral, os autores sugerem, através dos diferentes tratamentos avaliados que, a modulação do sistema da Trx-1 promove atenuação da HAP e do remodelamento VD. Alguns estudos avaliando o modelo de indução da HAP por hipóxia evidenciaram aumento da atividade da TrxR no tecido pulmonar após 4 semanas de hipóxia e aumento da atividade da TrxR após 48 h em células de músculo liso vascular, sugerindo um papel central para a Trx-1 na modulação da proliferação destas células induzida por hipóxia (CHEN et al., 2013). Um estudo mais recente, com modelo de hipóxia crônica, evidenciou redução da expressão da Trx-1 no tecido pulmonar, sendo que sua modulação positiva provocada pelo tratamento com

resveratrol atenuou a severidade da doença (XU et al., 2016). No entanto, a literatura não apresenta estudos avaliando o papel da Trx-1 no balanço redox e consequentemente, na sinalização envolvida com o remodelamento pulmonar na progressão da HAP experimental.

O desequilíbrio entre a síntese e a produção de agentes oxidantes e antioxidantes, em favor dos primeiros ou redução dos últimos, que acontece na HAP é chamado de estresse oxidativo (AGGARWAL et al., 2013; FULTON et al., 2017). O aumento do consumo de oxigênio promove o aumento da formação e liberação das ROS e estudos recentes têm evidenciado que o estresse oxidativo está intimamente ligado ao declínio funcional, sendo um potente mediador da HAP e da disfunção cardíaca (BELLO-KLEIN et al., 2018; BOGAARD et al., 2009; FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Ademais, o envolvimento do estresse oxidativo na HAP tem sido demonstrado a partir do aumento da atividade de diferentes fontes de ROS (HUMBERT et al., 2019; MIKHAEL et al., 2019; REIS et al., 2013), concentração elevada das ROS em diferentes tecidos (MOSELE et al., 2012), redução das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004; WANG; SHULTS; SUZUKI, 2017) e, ainda, através da atenuação da doença pelo uso de terapias antioxidantes ou que de alguma forma reduzam a concentração de ROS (LUDKE et al., 2010; MOSELE et al., 2012; NOZIK-GRAYCK et al., 2008; TÜRCK et al., 2020).

1.2.2.3 Disfunção autonômica

Assim como a disfunção endotelial, o estresse oxidativo e o estresse nitrosativo, alterações no sistema nervoso autonômico (SNA) exercem um papel crucial na progressão da HAP para ICD. O SNA ou sistema neurovegetativo representa a parte do sistema nervoso central responsável pelo controle de grande parte das funções viscerais do organismo, promovendo mudanças rápidas e intensas relacionadas ao controle dessas funções, através de componentes reguladores neurais e endócrinos. Os impulsos mediados pelo SNA se originam em centros da medula espinhal, do tronco cerebral, do hipotálamo e do córtex cerebral. O SNA pode ser dividido em componente simpático (SNS) e componente parassimpático (SNP), cujas ações geralmente antagônicas, geram um estado de equilíbrio dinâmico ou homeostase (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015).

O coração é ricamente inervado pelo SNA. O SNP apresenta maior inervação para as regiões de controle da frequência cardíaca, enquanto que o SNS atua principalmente na massa ventricular, sugerindo assim que a contração e o relaxamento cardíaco são controlados principalmente pelo SNS (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015; LYMPEROPOULOS; RENGO; KOCH, 2013; WAXENBAUM; VARACALLO, 2019). Quanto às respostas do sistema cardiovascular aos estímulos do SNA, observa-se que a ativação do SNS promove aumento da velocidade de despolarização diastólica com aumento da atividade do nodo sinoatrial, maior velocidade de condução, aumento do cronotropismo, lusitropismo e inotropismo; nos vasos sistêmicos, através da ativação dos receptores alfa adrenérgicos, acarreta vasoconstrição arteriolar, redução da capacitância venosa, aumento da PVR e da resistência renal, redução do fluxo sanguíneo e da excreção de sódio, gerando elevação das pressões e volumes ventriculares (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015; IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001). Já a estimulação parassimpática apresenta efeito oposto no coração e nos vasos sanguíneos que a possuem. No geral, a ativação do SNA é rigorosamente regulada para manter a homeostase dentro dos limites necessários para fornecer circulação sanguínea adequada a todo o corpo (GORDAN; GWATHMEY; XIE, 2015).

Inicialmente, devido ao aumento da pós-carga imposta ao VD, há aumento e ativação do SNS de forma instantânea, a fim de normalizar a função cardíaca, por meio do aumento da frequência cardíaca (FC) e da contratilidade. Um dos primeiros mecanismos ativados para controlar a função cardíaca é alteração da FC. Sabe-se que a elevação desta é em maior parte devida ao aumento da resposta simpática e diminuição da resposta parassimpática. Alterações na FC, definidas como variabilidade da frequência cardíaca (VFC) indicam a habilidade do coração em responder aos estímulos fisiológicos e ambientais, bem como compensar os efeitos advindos de doenças. Ou seja, quanto mais alta a VFC, melhor é o sinal de adaptação, representando mecanismos autonômicos eficientes (ACHARYA et al., 2006; AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003).

Na HAP, como a ativação adrenérgica no VD é similar ao que acontece na insuficiência cardíaca esquerda, os receptores adrenérgicos do VD apresentam expressão diminuída (BRISTOW et al., 1986), o que é considerado um biomarcador de exposição à estimulação adrenérgica excessiva. Estudos recentes evidenciaram um papel central para a hiperativação simpática em pacientes com HAP, correlacionando-os com o aumento da PVR e

menor sobrevida em um período de 5 anos (VAILLANCOURT et al., 2017). Intervenções empregadas para diminuir a ativação simpática e aumentar a ativação parassimpática e, com isso melhorar a HAP, têm sido testados (WANG et al., 2019), sugerindo assim que a modulação autonômica cardíaca está alterada na HAP. No entanto, pouco se sabe a respeito de quando ocorre essa ativação na progressão da HAP.

Dessa forma, tem crescido o interesse pela utilização de métodos capazes de avaliar a função autonômica na HAP. Dentre esses, destaca-se a análise espectral, que consiste num método linear de domínio de frequência, onde é feita a análise estatística dos sinais oriundos do cateterismo ventricular por períodos variáveis (alguns minutos). A partir desse registro, os intervalos entre os batimentos consecutivos são medidos em milissegundos, sendo os valores plotados em um gráfico denominado tacograma. A partir deste e por intermédio de algoritmos matemáticos, obtém-se a análise espectral. Dela deriva a densidade da potência espectral (PSD, do inglês *power spectral density*), que é obtida a partir da razão entre a área e a curva no gráfico. Em seguida, a PSD é decomposta em banda de alta frequência (HF, do inglês *high frequency*), que indica a atividade parassimpática, e em banda de baixa frequência (LF, do inglês *low frequency*) que indica a modulação simpática (MALLIANI et al., 1991; THAYER; HANSEN; JOHNSEN, 2010). Os valores dos componentes da análise espectral podem ser expressos em unidades normalizadas, enquanto que a relação entre o componente de baixa frequência e o de alta frequência – LF/HF - tem sido considerada uma medida do balanço simpato-vagal.

1.2.3. Modelo de hipertensão arterial pulmonar induzido por monocrotalina

O uso de modelos experimentais tem sido capaz de reproduzir as principais alterações induzidas por HAP e pelo *Cor pulmonale* e, dessa forma, tem contribuído para o atual entendimento da fisiopatologia da HAP, bem como para a investigação de novos alvos terapêuticos (MAARMAN et al., 2015; SZTUKA; JASIŃSKA-STROSCHEIN, 2017). Um dos modelos mais extensivamente empregados para o estudo da HAP é o modelo de monocrotalina (MCT) (SZTUKA; JASIŃSKA-STROSCHEIN, 2017).

A MCT é um alcaloide pirrolizidínico, encontrado em uma grande variedade de plantas, provenientes do gênero *Crotalaria*, como representado na figura 11.



Figura 11 – O gênero e as espécies que mais produzem MCT (disponível em <https://pt.wikipedia.org/wiki/Crotalaria>).

Essas plantas crescem em todos os continentes e correspondem a um grupo botanicamente diverso, incluindo 11 famílias, mais de 60 gêneros e aproximadamente 560 espécies. Alguns pesquisadores sugerem que espécies, contendo alcaloides pirrolizidínicos potencialmente tóxicos compreendem aproximadamente 3% das plantas com flores do mundo (HUXTABLE, 1990; SMITH; CULVENOR, 1981). No Brasil, mais de quarenta espécies crescem abundantemente em plantações de grãos e em pastagens e são conhecidas como “xique-xique”, “gizo de cascavel” ou “chocalho de cascavel”, pois possuem vagens secas que emitem som semelhante ao da cauda da cascavel (WILLIAMS; MOLYNEUX, 1987).

O uso da MCT como modelo experimental para indução de HAP e *Cor pulmonale* é empregado desde 1961 (LALICH; MERKOW, 1961). A figura 12 representa a sequência de eventos gerados após a administração de MCT. Para gerar seus efeitos tóxicos, a MCT precisa ser ativada no fígado. Nesse processo de desidrogenação realizada pelo citocromo P450 da família 3A, ocorre à formação de inúmeros metabólitos tóxicos, sendo o principal chamado Dehidromonocrotalina (DMCT) (WILSON et al., 1992), capaz de atingir órgãos extra-hepáticos, incluindo coração, pulmões, rins e sistema nervoso central (YAN; HUXTABLE,

1995). Acredita-se que os eritrócitos exerçam um papel de transportador desses metabólitos para os diferentes tecidos, uma vez que estudos têm demonstrado que as concentrações plasmáticas de MCT diminuem acentuadamente após algumas horas de indução. Inicialmente, a dehidromonocrotalina é transportada até os pulmões, onde promove uma inflamação vascular local, aumento da permeabilidade vascular e aumento da liberação de agentes vasoconstritores. Essas alterações endoteliais, que se estendem a todos os níveis da vasculatura pulmonar, são encontradas algumas horas após a administração da MCT e são consideradas o gatilho para a vasculite pulmonar e o remodelamento pulmonar obstrutivo (JONES et al., 2002). O espessamento da média pode ocorrer devido a uma combinação de maior teor de colágeno (KAMEJI; OTSUKA; HAYASHI, 1980), aumento do número de lâminas elásticas e aumento da massa muscular lisa entre as lâminas. O espessamento medial das artérias pequenas é proporcionalmente maior que o das artérias maiores (ALLEN; CHESNEY, 1972; LALICH; MERKOW, 1961; SHAH; PATEL; SEHGAL, 2005). Assim, a hipertrofia da túnica média representa o principal mecanismo pelo qual os metabólitos tóxicos da MCT promovem alterações na estrutura e função da vasculatura pulmonar (GOMEZ-ARROYO et al., 2012). Associado a isso, ocorrem lesões no lúmen dos vasos que consistem em mudanças no seu tamanho ou na sua forma, devido às projeções das células endoteliais e dos trombos conforme progressão da doença. Por fim, como consequência do remodelamento vascular pulmonar e com o intuito de manter o estresse de parede constante, o aumento da pós-carga promove o desenvolvimento de HVD (DUMITRASCU et al., 2008; GOMEZ-ARROYO et al., 2012), que em estágios mais tardios resulta em dilatação e ICD (COLOMBO et al., 2013a; GOMEZ-ARROYO et al., 2012; HESSEL et al., 2006; MEYRICK; REID, 1979; NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015).

Devido à necessidade de metabolização hepática, a MCT apresenta resposta tóxica variável entre espécies, linhagens e até entre animais da mesma espécie. Seu uso já foi verificado em primatas não humanos, gado, cães, cabras, cavalos, suínos, aves, coelhos, camundongos e ratos (FIRTH; MANDEL; YUAN, 2010). No entanto, devido à facilidade e simplicidade de manuseio, atualmente, os animais mais utilizados para o estudo da HAP induzida por MCT é o rato (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015).

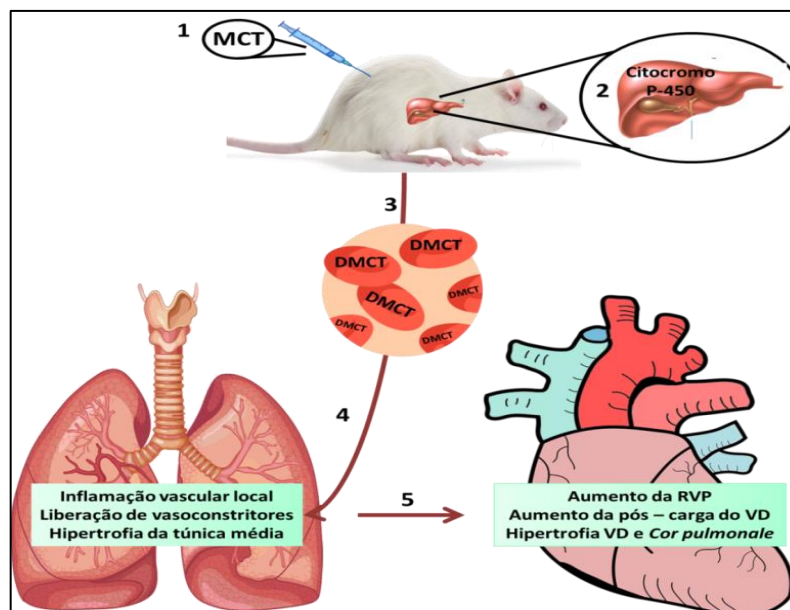


Figura 12 – Modelo de HAP induzida por MCT. Após a administração de dose única nos animais, a MCT é convertida em dehidromonocrotalina (DMCT) no fígado pelo complexo P-450. A DMCT é, então, levada até os pulmões, pelos eritrócitos, onde promove seus efeitos progressivos que culminarão, em estágios avançados, no desenvolvimento de *Cor pulmonale*. Fonte: quadro elaborado pela autora.

Além disso, outro importante determinante das alterações induzidas pela administração de MCT corresponde ao tempo de análise. Farahmand et al., 2004 (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004) observaram aumento na pressão sistólica do VD a partir do sétimo dia após a injeção de MCT, sendo que aos 14 dias encontraram HVD. Estudo feito por Daicho e colaboradores acompanhou animais injetados com MCT por 8 semanas, onde se verificou aumento do peso pulmonar, redução do peso corporal e hipertrofia cardíaca a partir de 14 dias, com sinais de ICD a partir da sexta semana (DAICHO et al., 2009). Dessa forma, percebe-se que os sinais clínicos da doença geralmente não são evidentes imediatamente após uma única exposição dos ratos à MCT. À medida que a lesão pulmonar e o remodelamento vascular progridem, os animais desenvolvem graus variáveis de dispneia, fraqueza, diarreia e cianose periférica (SCHOENTAL; HEAD, 1955). Importante destacar que a variabilidade de estudos com os efeitos da MCT deve-se não somente às diferentes janelas temporais, mas também às concentrações da droga, caracterizando-se como um modelo de efeitos tempo e dose-dependente. A administração de diferentes doses de MCT (30 mg/kg ou 80 mg/kg) promoveu após 4 semanas alterações funcionais e estruturais no VD de ambos os grupos. No entanto, a doença foi considerada muito mais branda no grupo que recebeu a menor dose (HESSEL et al., 2006).

Normalmente, esse modelo é utilizado visando a melhor compreensão dos mecanismos patológicos da HAP, uma vez que as alterações pulmonares e cardiovasculares são muito similares às encontradas em pacientes com HAP (GOMEZ-ARROYO et al., 2012). Utilizando o modelo de MCT, nosso grupo de pesquisa demonstrou que, após três semanas de HAP induzida por MCT (60 mg/kg) os animais apresentavam remodelamento vascular pulmonar e disfunção cardíaca direita, associado principalmente com o desequilíbrio do balanço redox tanto no VD quanto no pulmão (COLOMBO et al., 2013; DE LIMA-SEOLIN et al., 2018; LACERDA et al., 2018; LUDKE et al., 2010; MOSELE et al., 2012; TÜRCK et al., 2020; ZIMMER et al., 2017). Assim como nosso grupo de pesquisa, outros estudos envolvendo a HAP induzida por MCT são focados na análise de um ponto único, normalmente quando a doença está avançada e desenvolvida. Deste modo, é considerado um modelo apropriado para estudar em maiores detalhes a patofisiologia do desenvolvimento de HAP e *Cor pulmonale*, com a finalidade de identificar novas estratégias terapêuticas em humanos (HILL; GILLESPIE; MCMURTRY, 2017; SEYFARTH et al., 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial pulmonar é uma doença progressiva, incapacitante e sem cura. Ainda que estudos visando à compreensão dessa patologia sejam comuns, percebe-se que a literatura atual é escassa em relação a estudos que avaliem a progressão da doença, bem como os mecanismos envolvidos em seus diferentes estágios. Somado a isso, está o fato de que órgãos não centrais, como é o caso do VE, são pouco estudados nessa patologia. Dessa forma, torna-se essencial a análise temporal da doença, em diferentes estágios (1 semana = sem alterações cardíacas, 2 semanas = presença de HVD, 3 semanas = ICD com remodelamento cardíaco adverso, 4 semanas = ICD descompensada) e em diferentes tecidos (artéria pulmonar, pulmão, VD e VE), a fim de caracterizar os principais mecanismos e alterações presentes em cada um desses períodos, apontando para novas escolhas terapêuticas, bem como direcionando para a melhor janela de aplicabilidade, a fim de prevenir/tratar o remodelamento vascular pulmonar e o remodelamento ventricular mal adaptativo e a progressão para ICD.

3 HIPÓTESE

3.1 ARTIGO 1: Vias de sinalização envolvidas na remodelação pulmonar durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar experimental.

H0: não há contribuição da tioredoxina-1 no remodelamento vascular pulmonar dependente do balanço redox celular ao longo da progressão da HAP experimental.

H1: há contribuição da tioredoxina-1 no remodelamento vascular pulmonar dependente do balanço redox celular ao longo da progressão da HAP experimental.

3.2 ARTIGO 2: O papel do estresse oxidativo e nitrosativo pulmonar e comprometimento da reatividade da artéria pulmonar na progressão da HAP induzida pela MCT.

H0: a progressão da HAP experimental não é marcada pela presença de estresse nitrosativo e oxidativo no parênquima pulmonar, e nem pelo comprometimento da reatividade vascular pulmonar.

H1: a progressão da HAP experimental é marcada pela presença de estresse nitrosativo e oxidativo no parênquima pulmonar, e pelo comprometimento da reatividade vascular pulmonar.

3.3 ARTIGO 3: Papel da inflamação, estresse oxidativo e ativação do sistema nervoso autônomo durante o desenvolvimento do remodelamento cardíaco direito e esquerdo na hipertensão arterial pulmonar experimental.

H0: não há interação entre SNA, inflamação e estresse oxidativo no VD e VE durante as diferentes janelas temporais avaliadas na HAP;

H1: há interação entre SNA, inflamação e estresse oxidativo no VD e VE durante as diferentes janelas temporais avaliadas na HAP.

4 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a progressão da HAP induzida por MCT através da análise de parâmetros morfométricos, ecocardiográficos, hemodinâmicos, bioquímicos, moleculares e histológicos, a fim de caracterizar a evolução da doença em diferentes tecidos (artéria pulmonar, pulmão, ventrículo direito e ventrículo esquerdo) de ratos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.1.1 Artigo 1: Vias de sinalização envolvidas na remodelação pulmonar durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar experimental.

Todos os parâmetros serão analisados nas diferentes janelas temporais (1, 2 e 3 semanas), conforme protocolo experimental:

- Induzir o modelo de HAP por MCT em ratos machos;
- Analisar a influência da progressão da HAP na função ventricular direita por ecocardiografia transtorácica;
- Determinar a presença de hipertrofia cardíaca e hipertrofia ventricular direita;
- Mensurar a deposição de colágeno intersticial no VD e VE;
- Analisar a atividade da tiorredoxina redutase e da glutatona redutase no parênquima pulmonar;
- Determinar, por western blot, a expressão proteica da tiorredoxina-1, vitamina D3-proteína-1 regulada positivamente, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2, da razão entre a proteína quinase B total e fosforilada, da razão entre c-Jun N-terminal cinase total e fosforilada, da razão entre p38 total e fosforilada, da razão entre fator nuclear kappa β 65 total e fosforilado, proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons, caspase 3 clivada e da α - actina no parênquima pulmonar;

4.1.2 Artigo 2: A progressão da hipertensão arterial pulmonar induzida pela monocrotalina é caracterizada por estresse oxidativo e nitrosativo pulmonar e comprometimento da reatividade da artéria pulmonar.

Todos os parâmetros serão analisados nas diferentes janelas temporais (1, 2 e 3 semanas), conforme protocolo experimental:

- Induzir o modelo de HAP por MCT em ratos machos;
- Mensurar a massa corporal final e a ingestão alimentar dos animais;
- Avaliar a pressão média da artéria pulmonar;
- Determinar a presença de hipertrofia cardíaca e hipertrofia ventricular direita;
- Caracterizar a deposição de colágeno e a atividade das enzimas colagenase e elastase no parênquima pulmonar;
- Avaliar a extensão do dano ao parênquima pulmonar;
- Quantificar as células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) presentes no parênquima pulmonar;
- Determinar a espessura de parede das arteríolas pulmonares;
- Analisar a atividade da NADPH oxidase, da óxido nítrico sintase e das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) no parênquima pulmonar;
- Verificar a concentração de sulfidrilas e de espécies reativas totais no parênquima pulmonar;
- Mensurar o dano oxidativo a lipídios no parênquima pulmonar;
- Avaliar a marcação de nitrotirosina presente no parênquima pulmonar;
- Determinar, por western blot, a expressão proteica da enzima óxido nítrico sintase endotelial, da xantina oxidase, da superóxido dismutase-2 e dos receptores da endotelina-1, no parênquima pulmonar;
- Caracterizar as modificações induzidas pela MCT na reatividade vascular da artéria pulmonar.

4.1.3 Artigo 3: Papel da inflamação, estresse oxidativo e ativação do sistema nervoso autônomo durante o desenvolvimento da remodelação cardíaca direita e esquerda na hipertensão arterial pulmonar experimental.

Todos os parâmetros serão analisados nas diferentes janelas temporais (1, 2, 3 e 4 semanas), conforme protocolo experimental:

- Desenvolver o modelo de HAP por MCT em ratos machos;
- Mensurar o peso corporal dos animais;
- Elaborar uma curva de Kaplan – Meier;
- Analisar a influência da progressão da HAP na função ventricular direita e esquerda por ecocardiografia transtorácica;
- Verificar a hipertrofia cardíaca direita e a congestão hepática e pulmonar;
- Avaliar o perfil hemodinâmico por meio das medidas da pressão ventricular sistólica e diastólica final de ambos os ventrículos, e determinar o índice de contratilidade e relaxamento do VD e VE;
- Avaliar a função autonômica cardíaca por meio dos componentes simpático e parassimpático;
- Avaliar a influência da progressão da doença sobre a concentração de peróxido de hidrogênio, a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase), concentração de sulfidrilas e o dano oxidativo a lipídios de membrana no VD e VE;
- Identificar a presença ou não de infiltrado inflamatório no VD e VE.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Nota: os métodos descritos a seguir englobam o protocolo experimental e as análises realizadas nos três artigos que compõem esta tese:

Artigo 1: Vias de sinalização envolvidas no remodelamento pulmonar durante a progressão da hipertensão arterial pulmonar experimental.

Artigo 2: A progressão da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina é caracterizada por estresse oxidativo e nitrosativo pulmonar e comprometimento da reatividade da artéria pulmonar.

Artigo 3: Papel da inflamação, estresse oxidativo e ativação do sistema nervoso autônomo durante o desenvolvimento do remodelamento cardíaco direito e esquerdo na hipertensão arterial pulmonar experimental

Inicialmente, será apresentada a amostra e o protocolo experimental geral. Posteriormente, serão apresentados os métodos utilizados nos três artigos.

5.1 BIOÉTICA COM OS ANIMAIS

O estudo desenvolvido seguiu a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de animais; os Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo CONCEA, assim como aquelas normas contidas nas Diretrizes da Prática de Eutanásia, formulada em 2013 pela mesma instituição. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número de homologação 32151.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando aproximadamente 180 ± 10 gramas advindos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL – UFRGS). Os animais foram mantidos em caixas plásticas com medidas de 270 x 260 x 310 mm, totalizando três ou quatro animais por caixa. Os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS e mantidos em ambiente com temperatura controlada ($21 - 25^{\circ}\text{C}$), ciclo “claro-escuro” de 12 horas e umidade relativa de 70%. Água e ração comercial foram ofertadas “*ad libitum*”.

5.3 CÁLCULO AMOSTRAL

O tamanho amostral foi calculado pelo programa *Sigma Plot 11.0*. No cálculo do tamanho da amostra, foram considerados probabilidade de erro $\alpha = 0.05$ e poder do teste estatístico de 0.95. Tínhamos inicialmente 8 grupos experimentais, sendo 4 grupos controles (CTR 1w, CTR 2w, CTR 3w e CTR 4w) e 4 grupos MCT (MCT 1w, MCT 2w, MCT 3w e MCT 4w). Para cada grupo controle foi calculado um n de 8 animais, totalizando 32 animais. Para três grupos MCT foi calculado também um n de 8 animais para cada um desses grupos, totalizando mais 24 animais. No entanto, levando em consideração que a administração de MCT aumenta a taxa de mortalidade na fase avançada da doença (SOUZA-RABBO et al., 2008), foram adicionados 6 animais a mais no grupo MCT 4w, totalizando 14 animais. Ao todo, esse protocolo experimental fez uso de 70 animais (N=70). Devido à quantidade de análises, a aplicação de técnicas invasivas e a necessidade de obter tecido suficiente, foram realizadas duas vezes o mesmo protocolo experimental. Porém, devido à alta taxa de mortalidade encontrada no grupo MCT 4 semanas, durante o primeiro protocolo experimental, onde foram estabelecidos oito grupos experimentais, o segundo protocolo experimental foi realizado somente com seis grupos experimentais (CTR 1w, CTR 2w, CTR 3w, MCT 1w, MCT 2w, MCT 3w), contendo 8 animais em cada grupo e totalizando um N amostral de 48 animais. Dessa forma, foram usados 118 animais para realização dos três artigos que compõem essa tese.

5.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos 8 grupos experimentais:

Grupo Controle 1 semana – CTR 1w → animais que receberam a injeção de solução salina e que foram eutanasiados após uma semana do início do protocolo experimental;

Grupo Monocrotalina 1 semana – MCT 1w → animais que receberam injeção de monocrotalina e que foram eutanasiados após uma semana do início do protocolo experimental;

Grupo Controle 2 semanas – CTR 2w → animais que receberam a injeção de solução salina e que foram eutanasiados após duas semanas do início do protocolo experimental;

Grupo Monocrotalina 2 semanas – MCT 2w → animais que receberam injeção de monocrotalina e que foram eutanasiados após duas semanas do início do protocolo experimental;

Grupo Controle 3 semanas – CTR 3w → animais que receberam a injeção de solução salina e que foram eutanasiados após três semanas do início do protocolo experimental;

Grupo Monocrotalina 3 semanas – MCT 3w → animais que receberam injeção de monocrotalina e que foram eutanasiados após três semanas do início do protocolo experimental;

Grupo Controle 4 semanas – CTR 4w → animais que receberam a injeção de solução salina e que foram eutanasiados após quatro semanas do início do protocolo experimental;

Grupo Monocrotalina 4 semanas – MCT 4w → animais que receberam injeção de monocrotalina e que foram eutanasiados após quatro semanas do início do protocolo experimental.

Esses intervalos de tempo (1, 2, 3 e 4 semanas) foram escolhidos para representar a doença em estágios diferentes: 1 semana = sem alterações cardíacas, 2 semanas = presença de HVD, 3 semanas = ICD com remodelamento cardíaco adverso e 4 semanas = ICD descompensada.

5.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os protocolos experimentais são apresentados nas figura 13 e 14. Inicialmente, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos, controle (CTR) ou monocrotalina (MCT). No dia da indução (considerado dia 0 no protocolo experimental – figura 13 e 14) os animais dos grupos CTR receberam solução salina, enquanto os animais dos grupos MCT receberam MCT. A preparação da MCT está descrita no item 5.5.1. Em seguida, os animais do grupo CTR e MCT foram subdivididos em 3 ou 4 novos grupos, de acordo com a janela temporal de 1, 2 e 3 semanas (figura 13) ou 1, 2, 3 e 4 semanas (figura 14). Durante o protocolo experimental, os animais foram observados em relação ao peso corporal, a ingestão alimentar e qualquer sinal referente à instalação da doença (mudança na coloração dos pelos, presença de pelos ouriçados, dispneia, cianose e letargia).

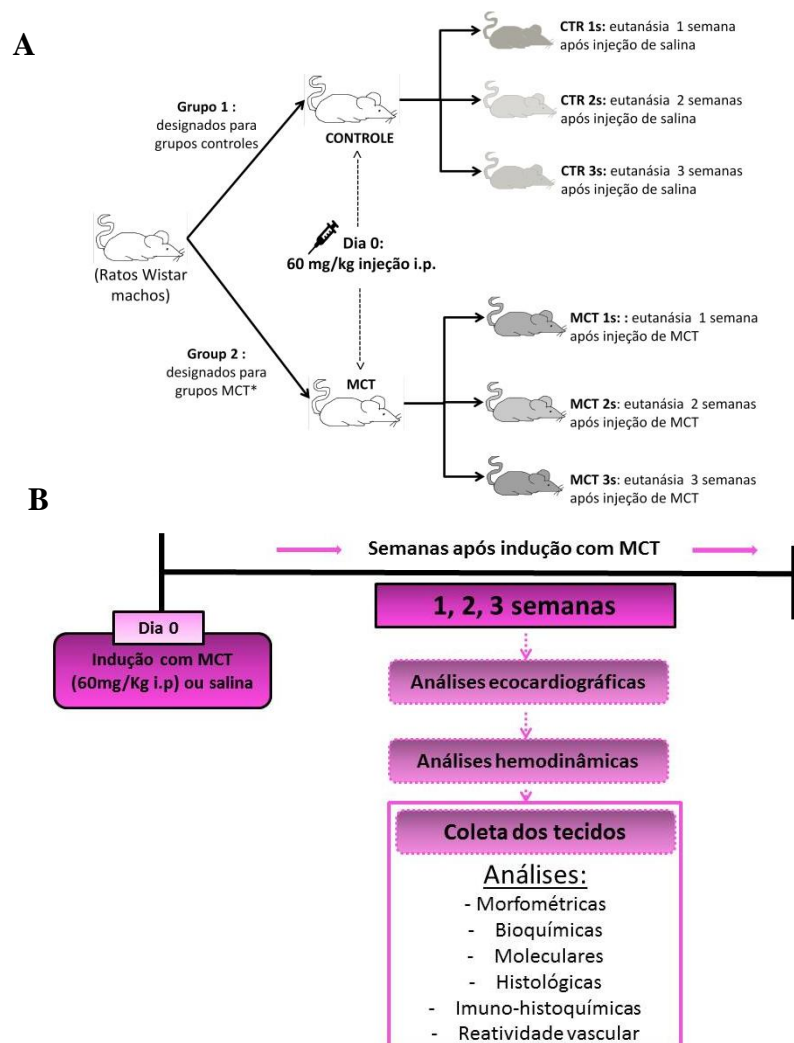


Figura 13 – (A) representação dos grupos experimentais e (B) protocolo experimental com duração de três semanas. CTR: controle; MCT: monocrotalina

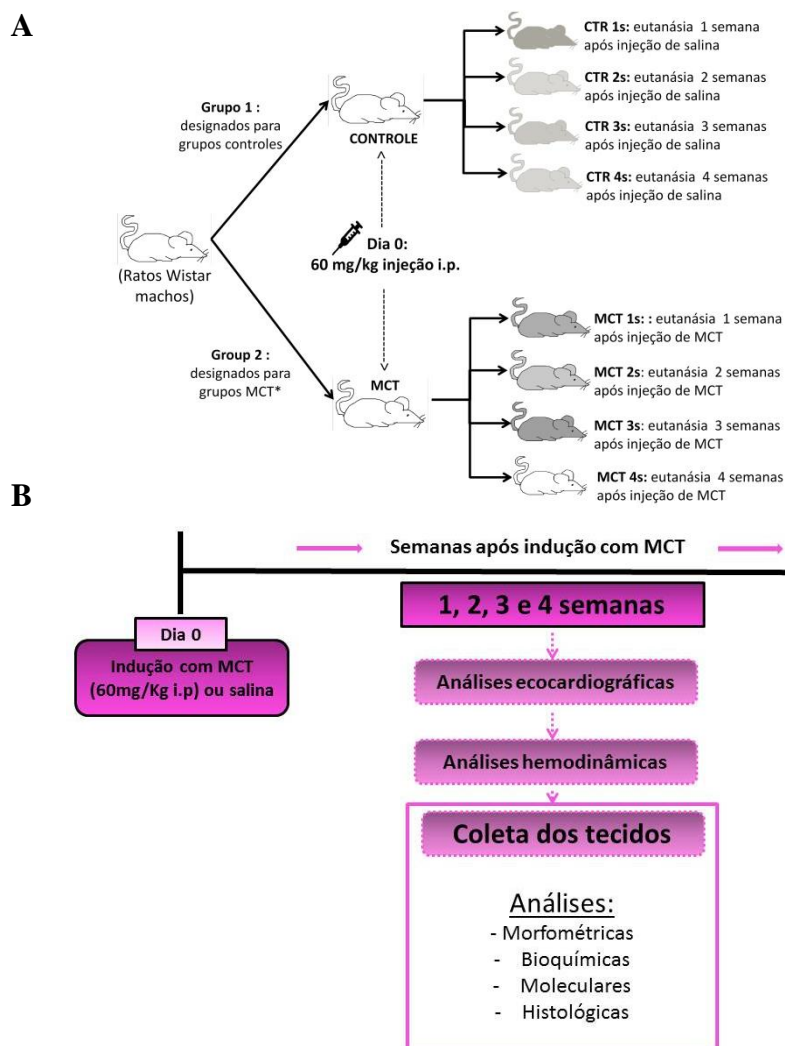


Figura 14 – (A) Corresponde aos grupos experimentais, enquanto a figura 14 (B) corresponde ao protocolo experimental com duração de quatro semanas. CTR: controle; MCT: monocrotalina

Ao final de cada semana, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg i.p.) e xilazina (10 mg/kg i.p.), conforme o Guia de Anestesia e Analgesia para Ratos e Camundongos, 2016 do CREAL /UFRGS e submetidos à análise ecocardiográfica do VD e VE. Ainda sob o efeito da anestesia, foram realizadas as análises hemodinâmicas do VD e VE. Com o objetivo de induzir a morte por sobrecarga anestésica, os animais receberam uma nova injeção i.p. de quetamina e xilazina. A confirmação da morte foi mediante decapitação em guilhotina manual. Esse procedimento ocorreu em ambiente apropriado, isolado da sala de alojamento onde se encontravam os demais animais, com higienização completa de todo o

material entre a morte de um animal e outro, tendo o responsável pelo procedimento experiência na sua realização. Após a eutanásia foi realizada a coleta dos tecidos (artéria pulmonar, coração [VD e VE], aorta, pulmões, fígado e tibia direita). Os pulmões, túbias e artéria pulmonar foram utilizados para testar a hipótese dos estudos 1 e 2, enquanto que o coração, os pulmões e os fígados foram utilizados para testar a hipótese do estudo 3.

5.5.1 Indução de HAP através da administração de monocrotalina

Os animais receberam uma injeção única de salina 0,9% (pH 7,4) ou monocrotalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) na dose de 60 mg/kg intraperitonealmente. A diluição da MCT, sendo 60 mg para 1 mL de volume final, foi realizada em 0,5 mL de HCl 1N. Após solubilizar, o pH foi ajustado até atingir 7,4 com adição de NaOH 1 N e, para complementar o volume final foi acrescentado NaCl 0,9% (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004).

5.6 DESCRIÇÃO DOS MÉTODOS UTILIZADOS:

A metodologia descrita a seguir refere-se aos métodos utilizados nos três estudos desta tese.

5.6.1 Análises ecocardiográficas

As imagens ecocardiográficas do VD foram obtidas através do modo bidimensional, modo M e do doppler pulsado (Sistema de Ultrassom Philips HD7, Andover, MA, USA), utilizando um transdutor piezoelétrico setorial S12-4 (Philips, Andover, MA, USA) (FORFIA et al., 2006; RUDSKI et al., 2010; URBONIENE et al., 2010).

O seguinte parâmetro indireto de mensuração da resistência vascular pulmonar foi avaliado:

- relação entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção do fluxo de sangue pela artéria pulmonar (AT/ET; s/s);

Os seguintes parâmetros de função sistólica do VD foram avaliados:

- excursão sistólica do plano do anel da tricúspide (TAPSE; cm);
- índice de *performance* do miocárdio (MPI) obtida através de $MPI = (\text{tempo de fechamento da valva tricúspide} - \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}) / \text{tempo de ejeção pela artéria pulmonar}$.

Como parâmetros diastólicos foram avaliados:

- relação entre a velocidade máxima do enchimento rápido e lento do VD (razão E/A; cm/s), e;
- diâmetros na sístole e na diástole do VD.

Para obtenção das imagens cardíacas do VE, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo (45°). Foi utilizado o sistema EnVisor Philips (Andover, MA, USA), com um transdutor de alta frequência e alta resolução (12-13 MHz), a 2 cm de profundidade, imagem fundamental e harmônica. Todos os parâmetros foram analisados nos níveis basal, medial e apical do coração, e o valor final foi obtido pela média entre os três níveis (NOZAWA et al., 2006; TAVARES et al., 2010). Como parâmetros da função sistólica do VE foram avaliados:

- mudança na área fracional (FAC) e,
- fração de ejeção (EF).

Como parâmetros diastólicos foram mensurados:

- diâmetros diastólico e sistólico final do VE.

5.6.2 Análises hemodinâmicas

Um cateter PE-50 foi inserido através da veia jugular direita no VD, sendo as gravações obtidas utilizando uma frequência de amostragem de 2 kHz, conectado a um transdutor (Strain-Gauge, transdutor de pulso miniatura PR-155 da Narco Biosystem; Houston, TX, EUA) e amplificador de pressão (amplificador de pressão HP 8850C) para registrar a pressão sistólica do VD (PSVD; mmHg), a pressão diastólica final do VD (PDVD; mmHg) e suas respectivas derivadas ($+dP/dt$ e $-dP/dt$; em mmHg / s), conforme exemplo na figura 15 (SOUZA-RABBO et al., 2008). A pressão arterial pulmonar média (mPAP) foi mensurada através da seguinte fórmula: $mPAP = 0,61 \times PSVD + 2$ (KOSKENVUO et al., 2010).

Para o registro da função do VE, outro cateter feito de tubo de Tygon e previamente soldado a um tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) foi inserido na artéria carótida direita e introduzido no átrio esquerdo e VE. As mesmas gravações foram obtidas, usando uma frequência de amostragem de 2 kHz e um transdutor de pressão conectado a um amplificador de sinal (Windaq, Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA, Amplificador de Pressão HP 8805C) (PERON et al., 2006). Foram registradas pressão sistólica e diastólica do VE, além de suas derivadas de pressão.

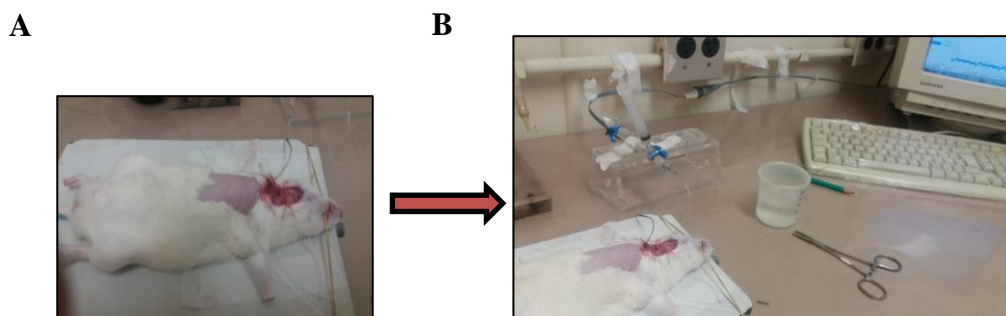


Figura 15 – (A) Rato anestesiado e cateterizado e (B) equipamento utilizado para registro hemodinâmico.
Fonte: autora deste trabalho.

5.6.3 Análise espectral

Para realização da análise espectral, alguns animais tiveram seu registro hemodinâmico cardíaco gravado por 5 minutos, a fim de coletar um registro com aproximadamente 200 - 250 batimentos estáveis. Para isso, todo o procedimento foi realizado em sala apropriada, com o mínimo possível de ruídos, enquanto a frequência respiratória e os reflexos dos animais foram observados, sendo administrado 1/3 da dose anestésica total quando necessário.

A partir dos registros cardíacos, sequências estáveis de 200 batimentos foram escolhidas aleatoriamente. Com base no intervalo de tempo entre dois picos sistólicos consecutivos, foi criada uma série de tacogramas. As sequências escolhidas foram, então, utilizadas para a quantificação da FC e a análise espectral foi realizada para avaliar a modulação autonômica, considerando dois componentes espectrais: o de baixa frequência (0,20 a 0,75 Hz), e o de alta frequência (0,75 a 4,00 Hz), os quais foram expressos em unidades normalizadas, sendo o de baixa frequência (LF) correspondente à modulação simpática e o de alta frequência (HF) correspondente à modulação parassimpática. A razão entre o espectro de potência das bandas LF e HF foi denominada índice LF / HF e representa o balanço simpátovagal (MALLIANI et al., 1991).

5.6.4 Reatividade vascular:

Imediatamente após a eutanásia dos animais, o tórax foi aberto, e a artéria pulmonar foi isolada e retirada. Após ser limpa, a artéria pulmonar foi colocada em um banho de órgãos (AVS Projetos, São Paulo, SP, Brasil) entre dois estribos de aço inoxidável e conectada a uma unidade de aquisição de dados computadorizada (AQCAD 2.0.5, AVS, São Paulo, SP) para medir a tensão isométrica, conforme exemplificado na figura 16.

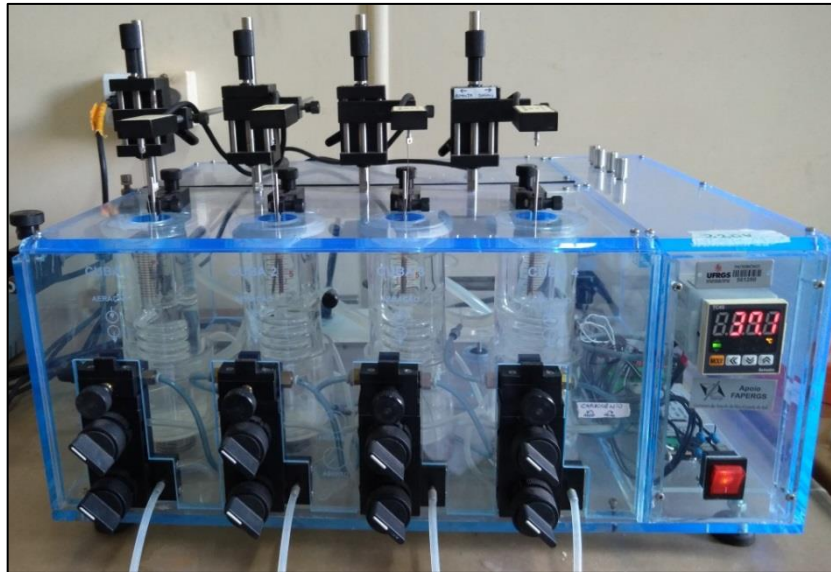


Figura 16 – Foto do banho de órgãos utilizado para reatividade vascular na artéria pulmonar
Fonte: autora deste trabalho.

Os anéis da artéria pulmonar foram colocados em uma câmara de órgãos de 10 mL contendo solução modificada de Tyrode (pH 7,4, a 37 ° C e gaseificadas com 95% de O₂ e 5% de CO₂) com a seguinte composição (em mmol /L): NaCl 123; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgCl₂ 1,2; NaHCO₃ 15,5; dextrose 11,5; e CaCl₂ 1.2. Os anéis foram inicialmente esticados até uma tensão basal de 1,5 g, antes de permitir que se equilibrassem no meio de banho. Cada anel foi lavado sequencialmente, reequilibrado e depois deixado para relaxar. Novamente, o anel pulmonar com o endotélio foi contraído, com curvas cumulativas de concentração-resposta para fenilefrina (Phe) (0,1 nmol / L a 10 µmol / L), seguidas por curvas cumulativas de concentração-resposta para acetilcolina (Ach) (0,1 nmol / L a 10 µmol / L) (MAM et al., 2010).

5.6.5 Análises morfométricas:

Após as análises funcionais, o coração foi rapidamente retirado e colocado em solução KCl 1,15% sobre o gelo. Com auxílio de material cirúrgico, tesouras e pinças, os átrios foram extraídos e descartados, e o peso dos ventrículos foi usado para mensurar a hipertrofia cardíaca através da razão entre peso do coração e peso corporal (mg/g), ou através da razão entre peso do coração pelo comprimento da tibia (mg/cm); enquanto que o VD foi dissecado

do VE e do septo para avaliar a hipertrofia do VD através da razão entre o peso do VD e o peso corporal, entre o peso do VD e o peso do VE mais o septo (índice de Fulton), entre o peso do VD / comprimento da tíbia (mg/cm) (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004; YIN; SPURGEON; RAKUSAN, 1982). Após a limpeza e pesagem dos ventrículos, parte dos tecidos foi destinada para análises bioquímicas e moleculares e, por isso, foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80°C, enquanto que o restante do tecido foi imerso em solução de paraformaldeído (4%) para a execução das análises histológicas.

Assim como o coração, os pulmões também foram rapidamente retirados, limpos (em NaCl 0,9%) e armazenados, conforme análise. Um pedaço padronizado dos pulmões foi destinado às análises bioquímicas e moleculares e por isso foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C, enquanto que outro pedaço (também padronizado) dos pulmões foi imerso em solução de paraformaldeído (4%) para a execução das análises histológicas e imuno-histoquímicas.

Para realizar a avaliação da congestão pulmonar e hepática, os tecidos foram pesados na coleta e diariamente até atingirem um peso constante. Durante esse período de pesagem os tecidos foram mantidos em uma estufa a 60 °C. A avaliação da congestão hepática e pulmonar foi obtida usando a razão de peso úmido / seco desses órgãos (DOS SANTOS LACERDA et al., 2017).

Além disso, durante todo o protocolo experimental, os animais foram observados quanto ao seu comportamento, surgimento de sinais característicos de IC, peso corporal, ingestão alimentar e taxa de mortalidade. A avaliação do peso corporal final foi obtida através da pesagem do animal previamente à eutanásia. Ao longo do protocolo experimental, os animais foram pesados em intervalos de três dias, para acompanhar a evolução do peso corporal, sendo esse resultado expresso em gramas (g). A ingestão alimentar foi medida a cada três dias pela diferença entre o peso dos alimentos oferecidos e as sobras subsequentes, durante todo o protocolo experimental, e os resultados foram expressos em gramas (g). Ainda, foi criada uma curva de Kaplan-Meier a fim de evidenciar a taxa de mortalidade induzida pela MCT ao longo da progressão da HAP.

5.6.6 Análises Bioquímicas

5.6.6.1 Preparação de tecidos:

As amostras foram pesadas e homogeneizadas (por 40 segundos) com cloreto de potássio a 1,15% (KCl) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mmol/L, usando um homogeneizador Polytron. Os tecidos homogeneizados foram centrifugados por 15 minutos a 20.000 rpm, em centrífuga refrigerada a 4 ° C (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24), sendo o sobrenadante coletado e utilizado para quantificar os seguintes parâmetros: quantificação de proteínas, atividade da superóxido dismutase (SOD), atividade da catalase (CAT), atividade da glutathione peroxidase (GPx), atividade da glutathione reductase (GR), atividade da tioredoxina reductase (TrxR), atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), teor de sulfidrilas, atividade da NADPH oxidase, concentração total de espécies reativas de oxigênio (ROS) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

5.6.6.1.1 *Quantificação de proteínas*

Solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL em água destilada foi utilizada para quantificar as proteínas presentes nas amostras avaliadas. Para essa técnica, descrita por Lowry e colaboradores, em 1951, as medidas foram efetuadas em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL (LOWRY et al., 1951).

5.6.6.1.2 *Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)*

A técnica usada para determinar a SOD é baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O radical superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete com o sistema de detecção do radical superóxido. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido que é

detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo a taxa de formação do pirogalol oxidado. Para este ensaio, 10 µL amostra foram usados na presença de tampão Tris 50 mM e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM, com a adição de 4 µL de 30 µM de catalase (Sigma-Aldrich, Catalase de fígado bovino [suspensão aquosa, 10.000-40.000 unidades]) e 8 µL de pirogalol 24 mM (Sigma-Aldrich, ≥ 98% [HPLC], peso molecular 126,11). Os resultados foram expressos como U SOD / mg de proteína em comparação com uma curva de SOD padrão (Sigma-Aldrich, superóxido dismutase de bovino, pó liofilizado, ≥ 1500 unidades / mg de proteína) (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

5.6.6.1.3 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT corresponde à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. Nesse estudo, a atividade da CAT foi medida através do decréscimo na absorbância do H₂O₂, no comprimento de onda de 240 nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Foram utilizados os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. A atividade foi expressa em pmoles de H₂O₂ reduzidos/min/ mg de proteína (AEBI, 1984).

5.6.6.1.4 Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx pode ser avaliada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx, uma vez que esta catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar a glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Assim, a atividade da GPx foi baseada no consumo de NADPH e foi medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 340 nm. O meio da reação continha solução fosfato 140 mmol/L, EDTA 1 mmol/L (pH 7,5), NADPH 0,24 mmol/L, azida sódica 1 mmol/L, utilizada para inibir a atividade da CAT; GSH 5 mmol/L, glutathione reductase (GR) 0,25 U/mL e hidroperóxido de tert-butila 0,5 mmol/L. A atividade foi expressa

como nmol de peróxido/hidroperóxido reduzidos/min/mg de proteína (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

5.6.6.1.5 Atividade da glutathiona redutase (GR)

A glutathiona redutase (GR), uma enzima dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), catalisa a formação de GSH a partir de GSSG que corresponde à forma oxidada da glutathiona. A atividade da GR é proporcional ao consumo de NADPH e pode ser monitorada espectrofotometricamente a 340nm (ANDERSON, 1985). Os resultados foram expressos em pmol/min/mg de proteína.

5.6.6.1.6 Atividade de tiorredoxina redutase (TRxR)

A atividade da TRxR foi determinada a partir da redução de 5', 5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) para TNB detectado a 340 nm. Neste ensaio, uma mistura de reagentes contendo DTNB (25 mg mL⁻¹), albumina (20 mg mL⁻¹), NADPH (20 mg mL⁻¹) e EDTA (0,2 mol/L) foi usada. Os resultados foram expressos como mmol TNB/mg de proteína (HOLMGREN; BJORNSTEDT, 1995).

5.6.6.1.7 Atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS)

A atividade da NOS foi avaliada pela medida da conversão da oxi-hemoglobina (HbO₂) em met-hemoglobina induzida por NO, como previamente descrito (VALDEZ; ZAORNYJ; BOVERIS, 2005). O meio de reação foi composto por (em mmol/L): CaCl₂ 1,8; KCl 2,7; MgCl₂ 0,23; NaCl 137; NaH₂PO₄ 3,6; glicose 5,0; HEPES 10; pH 7,4, contendo 2 mol/L HbO₂ e 1 mmol/L de L-arginina. A atividade da NOS foi expressa em nmoles NO/min/mg de proteína.

5.6.6.1.8 Concentração de sulfidrilas

Para o ensaio de sulfidrilas, o ácido 5,5-ditio-bis- (2-nitrobenzóico) (DTNB) libera o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), conforme descrito por Ellman (1959) (ELLMAN, 1959) e modificado por Hu e co-autores (HU et al., 1993). A absorbância foi medida a 412 nm (Anthos Zenyth 200 rt, Biochrom, Reino Unido), e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

5.6.6.1.9 Atividade da NADPH Oxidase

A atividade da enzima foi determinada em homogeneizado mediante técnica espectrofotométrica, seguindo o consumo de NADPH a 340 nm. No homogeneizado foi adicionado tampão fosfato 100 mmol/L pH 7,4 e NADPH 1 mg/mL. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/min.mg proteína (WEI et al., 2006).

5.6.6.1.10 Concentração total de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A partir do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) ocorre a formação do DCFH, que quando reage com o peróxido presente na amostra, induz à formação de DCF e emite fluorescência, permitindo, assim, que a concentração de espécies reativas de oxigênio seja quantificada (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992). Foi utilizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de DCF. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação (480 nm) e emissão (535 nm) (espectrômetro de fluorescência LS 55, Perkin Elmer, MA, EUA). Os resultados foram expressos como pmol/mg de proteína.

5.6.6.1.11 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O TBARS foi medido conforme descrito anteriormente (BUEGE; AUST, 1978). Neste método, o ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com os produtos da peroxidação lipídica, produzindo um composto que é medido a 535 nm. Os resultados dos TBARS foram expressos como nmol/mg de proteína.

5.6.6.2 Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂):

Os níveis de H₂O₂ foram analisados com base na oxidação do vermelho de fenol pelo H₂O presente na amostra, mediado pela peroxidase de rabanete. As amostras foram homogeneizadas em KCl (1,15% w/v) e PMSF (20 mmol/L), e centrifugadas (8000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C). Os sobrenadantes foram usados para as análises posteriores. Foi construída uma curva padrão com concentrações variadas de H₂O₂ de 10, 20 e 30 nmol/L. Após a adição do H₂O₂ na curva padrão e dos sobrenadantes dos homogeneizados nos poços da microplaca, o experimento continuou com a adição do tampão PRS (solução de vermelho de fenol). Depois de adicionar o tampão PRS, a microplaca foi agitada à temperatura ambiente durante 25 min. Em cada poço com amostra, foi adicionado 1 mol/L de hidróxido de sódio (NaOH). Em seguida, a leitura foi realizada a 610 nm e a concentração de H₂O₂ foi expressa em nmol/g de tecido (PICK; KEISARI, 1980).

5.6.6.3 Atividade da collagenase

Para o ensaio de collagenase, as amostras foram homogeneizadas (0,2 µg / µL) em tampão (50 mmol / L de tricina com 10 mmol / L de CaCl₂ e 400 mmol / L de NaCl, pH 7,5, 25 ° C). A atividade da collagenase foi medida usando N- (3- [2-furil] acrilil) -Leu-Gly-Pro-Ala (substrato FALGPA; Sigma-Aldrich, # F5135) em um modo cinético espectrofotométrico. A absorbância foi registrada a cada 5 minutos por 2 h a λ = 345 nm. A mistura de reação foi composta por 3,3 µl de amostra e 96,6 µl de tampão de ensaio contendo

substrato (solução de 1 mmol / L de FALGPA), combinados em uma placa de microtitulação. A quantificação de proteínas presente nas amostras foi obtida através do método de descrito por Lowry (LOWRY et al., 1951). A atividade da colagenase foi calculada usando uma solução padrão contendo 2 unidades / ml de colagenase de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, # C9891). A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg de proteína (GONZALEZ et al., 2018).

5.6.6.4 Atividade da elastase

As amostras foram homogeneizadas (0,2 µg de tecido por µL) em tampão (Tris HCl 100 mM, pH 8, 25 ° C) para o teste de elastase. A atividade foi medida usando N-succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida (substrato SucAla3-pNA; Sigma-Aldrich, # S4760) em um modo cinético espectrofotométrico. A absorbância foi registrada a cada 5 min por 2 h a $\lambda = 410$ nm. A mistura de reação foi composta por 16,5 µl de amostra, 76,8 µl de tampão de ensaio e 6,7 µl de solução de substrato (4,4 mol/L de substrato SucAla3-pNA), combinados em uma placa de microtitulação. A concentração de proteínas de todas as amostras foi medida pelo método de Lowry, usando albumina de soro bovino como proteína padrão. A atividade da elastase foi calculada usando uma solução padrão contendo 0,3 unidades / mL de elastase do pâncreas porcino (Sigma-Aldrich, # E1250). A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg de proteína (GONZALEZ et al., 2018).

5.6.7 Análises moleculares:

Para realização das expressões proteicas, por western blot, as amostras foram homogeneizados em um homogeneizador (Ultra-Turrax, Bosch, Atibaia, SP, Brasil) utilizando-se um tampão de lise celular (10x) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA), diluído em KCl e PMSF e posteriormente foram centrifugadas (8000 x g, 15 minutos, 4 °C). Cem microgramas de proteína (determinadas pelo método de Lowry) foram utilizados em um gel de eletroforese de poliacrilamida duodecilsulfato de sódio (ARAUJO et al., 2006; LAEMMLI, 1970). As proteínas separadas durante a eletroforese foram transferidas para

membranas difluoreto de polivinilideno, da empresa Bio-Rad (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brasil). As membranas foram processadas por imunodeteccção, utilizando os seguintes anticorpos primários: anticorpo anti-ETBR, anti-ETAR, anti-SOD2, anti-XO, anti-eNOS, anti-Trx-1, anti-Nrf2, anti-VDUP1, anti-Akt total e fosforilada, anti-JNK total e fosforilado, anti-p38 total e fosforilada, anti-NF κ B65 total e fosforilado, anti-HSP70, anti-caspase 3 clivada e α -actinina. A ligação dos anticorpos primários foi detectada com anticorpos secundários conjugados à peroxidase de rabanete. As membranas foram, então, reveladas pelo uso de reagentes para deteccção por quimioluminescência no iBright™ CL 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e foram analisadas com o programa ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, EUA). A densidade óptica de cada amostra foi normalizada de acordo com o imunoconteúdo de α -actinina ou através da razão entre a expressão fosforilada e total das proteínas.

5.6.8 Análises histológicas:

Inicialmente, as amostras foram imersas em formalina tamponada a 10%, processadas em concentrações crescentes de álcool e xilol e parafinizados em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Posteriormente, as amostras em parafina foram cortadas em seções de 3 μ m (pulmão) e 4 μ m (VD e VE) de espessura, fixadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou com picrosirius red.

As lâminas coradas com HE foram utilizadas para mensurar o infiltrado inflamatório no VD e no VE e área de seccão transversal dos cardiomiócitos. A área de seccão transversal de 100 cardiomiócitos (objetivo de 400X) foi avaliada nas secces coradas com HE, utilizando o software ImageJ (NIH, EUA), e os resultados foram expressos em milímetros (mm²), a fim de avaliar a hipertrofia/atrofia cardíaca. Ainda com as lâminas de HE do VD e VE, a presença de infiltrado inflamatório foi avaliada. Essas lâminas foram analisadas às cegas por um patologista especialista quanto à presença de infiltrado inflamatório, definido qualitativamente como ausente ou presente. Se presente, foi classificado como leve, moderado ou acentuado, de acordo com a quantidade de células inflamatórias e a extensão do infiltrado. Estes resultados foram expressos como porcentagem.

No tecido pulmonar, as lâminas de HE foram utilizadas para mensurar semiquantitativamente a extensão de dano e envolvimento do parênquima pulmonar pela inflamação, por meio de um exame cuidadoso de todo o tecido pulmonar disponível com aumento de 200x. O resultado dessa análise foi expresso como % da área do parênquima atingida. Além disso, para quantificar as células inflamatórias no tecido pulmonar, cinco campos microscópicos aleatórios de áreas contendo inflamação foram analisados, e os neutrófilos e linfócitos presentes em cada campo foram quantificados. Posteriormente, a média dos cinco campos por animal foi calculada e a média dos grupos experimentais foi avaliada. As lâminas de HE foram ainda utilizadas para mensurar a espessura das arteríolas pulmonares. Para essa análise, as arteríolas pulmonares com diâmetro externo <200 µm foram analisadas em microscópio binocular Olympus equipado com uma câmera de vídeo QColor 5X (Olympus®), com aumento de 200x. Resumidamente, o remodelamento arteriolar pulmonar foi avaliado como a porcentagem da espessura da parede medial (% WT), calculada da seguinte forma: $WT (\%) = \frac{\text{diâmetro externo} - \text{diâmetro interno}}{\text{diâmetro externo}} \times 100$ (LIU et al., 2018).

As lâminas coradas com Picosirius red foram utilizadas para determinar a deposição intersticial de colágeno no VD, VE e no parênquima pulmonar. As imagens microscópicas foram capturadas com ampliação de 100x com um microscópio binocular Olympus equipado com uma câmera de vídeo QColor 5X (Olympus®). Com o software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD, Estados Unidos). A fração volumétrica de colágeno foi quantificada como a razão entre a soma da área total do colágeno intersticial e a soma das áreas totais (colágeno + não colágeno) em todo o campo das imagens capturadas. Os dados foram expressos em porcentagem (%) (BRUCE et al., 2015; LI et al., 2013).

5.6.9 Análises imuno-histoquímicas:

Para imuno-histoquímica, as seções de tecido pulmonar foram transferidas para lâminas silanizadas e desparafinizadas em estufa por 1 h. A recuperação antigênica foi realizada em uma panela de pressão por 10 min a 110 ° C, em tampão de citrato de pH 9, e as lâminas foram resfriadas no tampão por 20 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pelo contato com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 20 min.

O bloqueio de proteínas foi realizado com leite em pó desnatado a 5% em solução salina tamponada com fosfato por 20 min. As seções foram subsequentemente incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário: nitrotirosina (39B6) (1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc-32757). O anticorpo secundário foi aplicado na diluição de 1: 200 e incubado por 90 min em temperatura ambiente, e a reação foi visualizada com Liquid Dab (Dako), conforme recomendado pelo fabricante. Após a visualização, as lâminas foram contrastadas com hematoxilina Harris por 20 s, desidratadas em álcool absoluto e colocadas em xilol para montagem com Entellan. Havia controles externos positivos e negativos (LILLIE; FULLMER, 1976). O controle negativo foi obtido substituindo o anticorpo primário por soro não imune, para confirmar a especificidade da reação. As variáveis categóricas foram analisadas por descrição de frequência relativa, representadas em uma escala de coloração dos anticorpos com os seguintes dados: Grau 0 (ausente), grau 1 (leve), grau 2 (moderado) e grau 3 (acentuado) e os resultados foram expressos como % da frequência relativa de cada grau.

5.7 CUIDADOS COM RELAÇÃO AO DESCARTE DE AMOSTRAS E MATERIAIS TÓXICOS

Todos os procedimentos experimentais foram feitos com uso dos equipamentos de proteção individual adequados: avental, luva cirúrgica, e óculos e máscara quando necessário. O descarte de amostras, bem como de materiais tóxicos e contaminantes foi realizado conforme regras estabelecidas pela UFRGS. As carcaças dos animais mortos foram colocadas em sacos plásticos brancos e encaminhadas ao biotério setorial no ICBS - UFRGS, onde foram recolhidas por empresa terceirizada, responsável pelo serviço de coleta de materiais biológicos de descarte. Materiais tóxicos foram usados na capela e os descartes encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância de duas vias (ANOVA 2-way) e complementadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os desfechos que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste estatístico de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis. Os dados de reatividade vascular foram analisados usando o teste t de Student para dados não pareados. As curvas de concentração-resposta foram, posteriormente, analisadas usando uma curva sigmoideal de regressão não linear de melhor ajuste. A correlação entre duas variáveis foi analisada pelo teste de correlação de Pearson. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média ou como mediana e intervalos interquartis [25 – 75]. Foi considerada uma probabilidade de erro alfa menor ou igual que 0,05 ($P \leq 0,05$).

6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados no formato de 3 artigos, sendo que para facilitar a leitura, cada artigo será apresentado de forma separada em capítulos, como descrito a seguir:

6.1 Artigo 1: Signaling pathways involved in pulmonary remodeling during the progression of experimental pulmonary arterial hypertension (Capítulo 1).

6.2 Artigo 2: The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity (Capítulo 2).

6.3 Artigo 3: Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension (Capítulo 3).

6.1 CAPÍTULO 1

Título do artigo 1: Signaling pathways involved in pulmonary remodeling during the progression of experimental pulmonary arterial hypertension.

Status: submetido para a revista Life Sciences, no dia 28 de novembro de 2020.

Life Sciences
SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN PULMONARY REMODELING DURING THE PROGRESSION OF EXPERIMENTAL PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length article
Keywords:	thioredoxin; VDUP-1; glutathione reductase; cell-signaling process; experimental pulmonary arterial hypertension; time-course
Corresponding Author:	Adriane Belló-Klein, Ph.D Federal University of Rio Grande do Sul Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL
First Author:	Alexandra Zimmer, MSc.
Order of Authors:	Alexandra Zimmer, MSc. Rayane Brinck Tebeira, PhD. Rosalia Lempik Constantin Patrick Turck, PhD. Fernanda Vsioli, PhD. Guilherme Baldo, PhD. Paulo Cavalheiro Schenkel, PhD. Alex Sander da Rosa Araujo, PhD. Adriane Belló-Klein, Ph.D
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	This study aimed to evaluate the role of the thioredoxin (Trx) system in signaling pathways involved in pulmonary remodeling during the progression of the monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension (PAH). Male rats were first divided into two groups: monocrotaline (MCT) and control. MCT group received a single intraperitoneal injection of MCT (50 mg/kg), while controls received the same volume of saline. MCT and control groups were further divided into 3 groups: 1, 2, and 3 weeks. Animals were submitted to echocardiographic analysis. Right and left ventricles were used for measurement of hypertrophy, through morphometric and histological analysis. The lung was prepared for biochemical and molecular analysis. After one week of MCT injection, there was an increase in thioredoxin reductase (TrxR) activity, reduction of glutathione reductase (GR) activity, and increase in Trx-1 and vitamin D3 up-regulated protein-1 (VDUP-1) expressions. Two weeks after MCT injection, it was seen an increase in VDUP-1, pAkt/Akt ratio, pNF- κ B/p65/NF- κ Bp65 ratio, and cleaved caspase 3, and a decrease in Trx-1, Nrf2, and HSP70 expressions. PAH-induced by MCT promoted a reduction in Nrf2, Trx-1, and HSP70 expressions as well as an increase in pAkt/Akt, pNF- κ B/p65/NF- κ Bp65, and VDUP-1 expressions, after three weeks. A relationship between these proteins activation and AT/ET ratio was evidenced, suggesting an association amongst Trx system and the functional changes in the progression of PAH. It seems that Trx-1 activation was an adaptive response to the MCT administration to cope with pulmonary remodeling and disease's progression, suggesting a potential new target for PAH therapeutics.
Suggested Reviewers:	Waner Simonides waner.simonides@vumc.nl Dr. Simonides has experience with this experimental model and with oxidative stress measurements. Susana Liesuy susana.liesuy@hospitalitaliano.org.ar Dr. Liesuy has a good experience with oxidative stress and redox signaling.

	<p>Pawan Singal PSingal@sbrc.ca Dr. Singal is an expert in the experimental model as well as in oxidative stress evaluation in cardiovascular disease.</p>
	<p>Neelam Khaper neelam.khaper@ncsm.ca Dr. Khaper has a great experience with intracellular signaling and oxidative stress.</p>

Dr. L.E.Wold
Editor-in-chief
Life Sciences

November 28th. , 2020.

Dear Editor,

We are submitting to your evaluation the manuscript entitled “Signaling pathways involved in pulmonary remodeling during the progression of experimental pulmonary arterial hypertension” for publication in the category of original article in the Life Sciences.

This work evaluates, for the first time, the role of the antioxidant thioredoxin-1 in the modulation of signaling pathways involved in pulmonary cell proliferation and death as well as inflammation in different stages of the *in vivo* model of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension (PAH). In this study, it was shown that the thioredoxin system activation is inversely correlated with functional parameters (measured by echocardiography) that characterize PAH development.

We state that all authors have contributed significantly to the work. All authors have read the manuscript and agree to its publication. The authors declare that there are no conflicts of interest.

We would like to highlight that the manuscript is original and has not been published elsewhere, nor is it currently under consideration for publication elsewhere.

Thank you for considering our manuscript for publication in this journal. Looking forward to hearing from you soon.

With best regards,

Dr. Adriane Belló-Klein
Physiology Department – ICBS - UFRGS
Rua Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170 – Porto Alegre – RS - Brazil
Email: belklein@ufrgs.br
Telephone: +55 (51) 3308-3621 Fax: 552151 33083656

6.2 CAPÍTULO 2

Título do artigo 2: The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity.

Revista: European Journal of Pharmacology

Data de aceite: outubro de 2020

Disponível em: [10.1016/j.ejphar.2020.173699](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173699)

6.3 CAPÍTULO 3

Título do artigo 3: Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension.

Revista: Molecular and Cellular Biochemistry

Data de aceite: novembro de 2019

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03652-2>

7 DISCUSSÃO

A relevância desta tese encontra-se no fato de termos realizado uma análise temporal da hipertensão arterial pulmonar (HAP) e da insuficiência cardíaca direita (ICD) induzida por monocrotalina (MCT), associando alterações no pulmão, artéria pulmonar, ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE). Apesar de alguns desses parâmetros já terem sido relacionados com a doença, nosso estudo mostrou essas mudanças em diferentes estágios, a fim de caracterizar as alterações presentes nos diferentes tecidos e servir, posteriormente, como base na escolha de alvos terapêuticos e na janela de aplicabilidade desses tratamentos.

Uma discussão conclusiva será apresentada a seguir, conforme a ordem de eventos da doença. Deste modo, procuraremos abordar de forma mais abrangente o conjunto de resultados obtidos, visando, no entanto, manter uma linha de raciocínio que favoreça a compreensão de nossos dados.

7.1 MODELO DE MCT COMO INDUTOR DA HAP E ICD

Atualmente, o modelo de MCT é considerado o mais usado para a compreensão dos mecanismos envolvidos na HAP, bem como na busca por novos alvos terapêuticos. Isso se deve, principalmente, ao seu fácil manuseio, baixo custo e alta similaridade de alterações pulmonares e cardíacas encontradas em pacientes (NAEIJJE; DEWACHTER, 2007). Sabe-se que o dano gerado pela MCT é dependente de fatores como dose, tempo de avaliação e espécie utilizada, uma vez que sua toxicidade é causada pelo subproduto produzido durante o seu metabolismo hepático. Neste estudo, optamos pela administração de dose única de MCT de 60 mg/kg i.p. em ratos, uma vez que está bem estabelecida na literatura por promover HAP e ICD (CAI et al., 2019; COLOMBO et al., 2013; FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004; OKUMURA et al., 2015).

A Tabela 3 resume os principais achados que demonstram a instalação do modelo de HAP induzida por MCT.

Tabela 3. Instalação da HAP induzida pelo modelo de MCT

Parâmetros	MCT 1 semana	MCT 2 semanas	MCT 3 semanas	MCT 4 semanas
Aspectos gerais				
Taxa de mortalidade	0%	0%	0%	100%
Ganho de peso corporal	Não alterou	Reduziu	Reduziu	-
Ingestão alimentar	Não alterou	Reduziu	Reduziu	-
Sinais da HAP	Ausente	Presente	Presente	-
Análises Morfométricas				
Hipertrofia cardíaca	Ausente	Presente	Presente	-
Hipertrofia VD	Ausente	Presente	Presente	-
Congestão Pulmonar	Ausente	Ausente	Presente	-
Congestão Hepática	Ausente	Ausente	Presente	-
Análises Hemodinâmicas				
mPAP	Não alterou	Aumentou	Aumentou	-
Pressão Sistólica do VD	Não alterou	Aumentou	Aumentou	-
Pressão Diastólica do VD	Não alterou	Não alterou	Aumentou	-
Derivadas de contratilidade e relaxamento do VD	Não alterou	Não alterou	Aumentou	-
Pressão Sistólica do VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou	-

Continuação da tabela 3. Instalação da HAP induzida pelo modelo de MCT

Parâmetros	MCT 1 semana	MCT 2 semanas	MCT 3 semanas	MCT 4 semanas
Pressão Diastólica do VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou	-
Derivadas de contratilidade e relaxamento do VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou	-
Análises Ecocardiográficas				
Razão AT/ET	Não alterou	Não alterou	Reduziu	-
Função sistólica (TAPSE) no VD	Não alterou	Não alterou	Reduziu	-
Função diastólica (E/A) no VD	Não alterou	Não alterou	Reduziu	-
Diâmetro sistólico e diastólico do VD	Não alterou	Não alterou	Aumentou	-
Parâmetros de função sistólica do VE (FAC e EF)	Não alterou	Não alterou	Não alterou	-
Diâmetro sistólico e diastólico do VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou	-
Análise histológica do VD e VE				
Colágeno VD	Não alterou	Não alterou	Aumentou	-
Colágeno VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou	-

Uma das principais características do modelo de MCT é a alta severidade e altas taxas de mortalidade. Inicialmente, havíamos planejado realizar a análise temporal por um período de quatro semanas. No entanto, devido à alta mortalidade não obtivemos nenhum animal vivo até esse período, o que inviabilizou a análise nesse tempo de estudo. Nosso resultado corrobora outros relatos da literatura que, utilizando a mesma dose de MCT, encontraram 100% de mortalidade após quatro e cinco semanas de indução com MCT (SOUZA-RABBO et al., 2008; UMAR et al., 2011). Doses mais baixas (40 mg/kg) e mais altas (80mg/kg) também já foram utilizadas, evidenciando taxas de sobrevivência de 55% nos animais que receberam dose baixa de MCT após quatro semanas (ZHUANG et al., 2018), enquanto as doses mais elevadas promoveram 100% de mortalidade nos animais dentro de oito dias (TAKAHASHI et al., 1996). Assim como esse modelo experimental, a HAP em humanos apresenta grande severidade e rápida progressão, sendo que, se não tratada, a expectativa de vida acaba sendo inferior a três anos (RICH; BRUNDAGE, 1987). No entanto, o uso de modelos experimentais permitiram a descoberta e a utilização de tratamentos que aprimoraram a expectativa de vida desses pacientes (LAU et al., 2017), evidenciando a importância de estudos experimentais.

Foi observado, nesta tese, que a administração de MCT não induziu nenhuma alteração na primeira semana do protocolo experimental, em relação a aspectos gerais, morfométricos, hemodinâmicos e ecocardiográficos (Tabela 3). No entanto, inúmeras alterações foram encontradas nos grupos que receberam MCT após duas e três semanas do protocolo experimental, como descrito a seguir.

Sabe-se que a administração de MCT promove redução no ganho de peso corporal. Nesta tese, evidenciamos que o ganho de peso corporal dos animais dos grupos MCT 2 e 3 semanas reduziu em relação aos seus grupos controles. Isso se deve, provavelmente, à soma de fatores envolvendo aumento de toxicidade gerada pelo metabolismo hepático (fases iniciais), prejuízo na capacidade ventilatória (fases mais avançadas) e alterações nas funções absorptivas. Outros estudos também evidenciaram redução do peso corporal dos animais que receberam MCT (OKUMURA et al., 2015; SILVA et al., 2019; STEFFEN; LEES; BOOTH, 2008). Podemos inferir, ainda, que esse menor ganho de peso corporal observado possa estar relacionado com a menor ingestão alimentar, que foi encontrada nos animais que receberam MCT na segunda e terceira semanas do protocolo experimental. Dessa forma, notamos que os animais doentes se alimentaram menos do que os seus respectivos controles, o que pode ser

explicado pela progressão e agravamento da doença, limitando seus movimentos e, conseqüentemente, a busca pela comida. Por mais que nenhuma análise quantitativa tenha sido realizada, observações diárias foram suficientes para notarmos a menor movimentação dos animais MCT dentro das caixas. Um estudo evidenciou redução do consumo de ração no período entre o 10° e o 14° dia (MARUYAMA et al., 1997), enquanto outro estudo notou essa redução entre a 4° e a 6° semana após a administração da MCT (LEINEWEBER; SEYFARTH; BRODDE, 2000). Parece que todos esses fatores associados ao maior gasto energético, através da respiração rápida e do esforço respiratório, contribuíram para o menor ganho de peso nos animais dos grupos MCT duas e três semanas. Dessa forma, sabendo que a menor ingestão alimentar e o menor ganho de peso corporal são características importantes que determinam os primeiros sinais da presença de doença respiratória, acreditamos que isso reflita o desenvolvimento de HAP nesses animais.

Reforçando a ideia de instalação da HAP, observamos a presença de sinais clássicos induzidos pela administração de MCT, incluindo dispneia, mudança na coloração e arranjo da pelagem, letargia, cianose e ascite. Essas alterações foram se tornando constantes, principalmente a partir da segunda semana do protocolo experimental e se agravando conforme a progressão do mesmo.

Outro fator que reforça o desenvolvimento de HAP foi o aumento da mPAP e da pressão sistólica do VD. Neste estudo, o aumento da mPAP (>20 mmHg) foi acompanhado pelo aumento da pressão sistólica do VD nos animais com HAP em duas e três semanas de indução com MCT, sugerindo que para o mesmo volume de ejeção foi necessária uma força contrátil muito maior devido ao aumento na PVR e da pós-carga. Atualmente, a determinação da mPAP por cateterismo do VD é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da HAP e, segundo o último Simpósio Mundial de HP, pessoas que apresentem mPAP acima de 20 mmHg são diagnosticadas com a doença (SAHAY, 2019; SIMONNEAU et al., 2019). Associado a isso, foi observada redução da razão AT/ET, mensurada na artéria pulmonar, nos animais MCT três semanas. A razão AT/ET corresponde a uma medida ecocardiográfica muito importante, pois representa a razão entre o tempo de aceleração pelo tempo de ejeção na artéria pulmonar e é relacionada indireta e inversamente com a PVR. Com a redução observada nos animais após três semanas da indução com MCT, sugere-se que a PVR foi bastante elevada neste período, contribuindo para o aumento exacerbado na pós-carga dessa câmara cardíaca.

Associado ao aumento da mPAP e da pressão sistólica do VD, o desenvolvimento de HAP induziu aumento na pressão diastólica e nas derivadas de pressão (contratilidade e relaxamento) do VD na terceira semana do protocolo experimental, sugerindo um aumento também da pré-carga para esse ventrículo, nesse estágio da doença. Nosso estudo corrobora parcialmente o estudo de Farahmand e colaboradores, uma vez que esses autores evidenciaram aumento da pressão sistólica e diastólica no VD na segunda semana do protocolo experimental (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Um estudo mais recente, porém, evidenciou aumento da pressão sistólica, sem alteração da pressão diastólica na segunda semana do modelo (BRUCE et al., 2015), sendo este o mesmo padrão de alterações encontrado no nosso estudo. Enquanto isso, no VE, não foi observada nenhuma alteração nas suas pressões ventriculares em nenhum dos tempos de análise. Percebe-se, assim, que essas alterações funcionais do VD reforçam a tentativa desta câmara cardíaca de combater a sobrecarga de pressão e manter sua função de bomba adequada.

Em situações normais, VD e VE geralmente começam a se desenvolver com 3,5 mm de espessura de parede no pré-natal, mas devido às diferentes funções, a espessura do VE (11mm) é quase três vezes maior do que a do VD (4mm) (RYAN; ARCHER, 2014). No entanto, a fim de acomodar o aumento crônico da PVR e da mPAP induzido pela doença, notou-se que VD e VE tiveram seus tamanhos alterados. A administração de MCT induziu HVD após duas e três semanas e aumento da área dos cardiomiócitos após três semanas. Esse resultado, que corresponde inicialmente a uma transformação adaptativa no VD desencadeada pela sobrecarga de pressão, reforça o efeito direto e precoce da HAP no lado direito do coração. Nosso estudo corrobora outros relatos da literatura que evidenciaram HVD após duas, três, quatro e seis semanas da indução com MCT (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004; MATORI et al., 2012). No entanto, mesmo que não tenhamos avaliado nesta tese, alguns estudos sugerem que o aumento do tamanho do cardiomiócito, não seja acompanhado por um aumento proporcional do número de capilares (COLOMBO et al., 2013; ZELT et al., 2019). Nesse caso, com o aumento dos cardiomiócitos do VD no nosso estudo, acreditamos que esse fato possa estar contribuindo para o prejuízo no suprimento de oxigênio e nutrientes para o coração hipertrofiado, colaborando para o desenvolvimento de ICD. Em contrapartida, no VE a MCT induziu redução da área dos cardiomiócitos apenas após três semanas, sem afetar o tamanho total desta câmara cardíaca.

Além das alterações pressóricas e estruturais, o desenvolvimento de HAP promoveu prejuízo sistólico e diastólico avaliado por ecocardiografia. A análise ecocardiográfica constitui em um método não invasivo de monitoramento da progressão da HAP e seu efeito na função e estrutura do VD (PORTNOY; RUDSKI, 2015; RUDSKI et al., 2010). A partir de estudos da década de 50, houve a identificação do principal eixo de encurtamento das fibras musculares no VD, que se caracterizou principalmente pela aproximação no sentido longitudinal, ou seja, o movimento do ápice em direção à base do coração. Uma maneira de se estimar clinicamente a contratilidade longitudinal é através da avaliação do padrão de movimentação da valva tricúspide (TAPSE). Neste estudo, encontrou-se que o desenvolvimento de HAP promoveu redução da TAPSE na terceira semana para valores associados com a disfunção cardíaca e com o baixo prognóstico de sobrevivência. Isso porque valores de TAPSE $> 0,20$ cm são considerados normais (FORFIA et al., 2006), enquanto que valores inferiores a 0,18 cm apresentam boa acurácia para a detecção de disfunção de VD e são marcadores de mal prognóstico. Além do prejuízo na função sistólica, os dados ecocardiográficos revelaram a presença de disfunção diastólica, através da redução da razão entre o tempo de enchimento rápido e lento do VD (razão E/A) e o aumento dos diâmetros sistólicos e diastólicos do VD, na terceira semana após indução com MCT. Essas alterações associadas ao aumento da pressão diastólica do VD sugerem a presença de dilatação dessa câmara cardíaca nos estágios avançados da doença. Isso significa que o aumento da pós-carga ao VD, decorrente do aumento da PVR e da mPAP, resultam em maior volume residual e desencadeiam aumento da pré-carga, promovendo aumento do raio interno dessa câmara. Tudo isso levou a um ciclo vicioso que parece resultar em ICD.

Ainda, para estimar a função miocárdica, foi mensurado o índice de *performance* do miocárdio (MPI) (KAKOUROS et al., 2011). Foi encontrado que a HAP induzida por MCT promoveu, após três semanas de indução, aumento desse índice, sugerindo que o esforço que o miocárdio exerceu para manter sua função de bomba estava aumentado nesses animais. Em um estudo de 2011, foi observada correlação positiva entre a PVR promovida pela HAP e o esforço do miocárdio (LEICHSENTRING-SILVA et al., 2011). Acredita-se que, de fato, com o aumento da PVR e da pós-carga observada nos animais, o coração tenha que aumentar seu esforço para manter a sua função e que alvos terapêuticos que visem à atenuação desse parâmetro podem ser benéficos no controle da progressão do remodelamento patológico do VD.

Enquanto isso, no VE não foram observadas diferenças significativas entre os distintos grupos experimentais nos parâmetros ecocardiográficos avaliados, incluindo fração de ejeção (EF), mudança da área fracional (FAC) e diâmetros na sístole e na diástole, sugerindo assim que o VE tenha sofrido pouca ou nenhuma sobrecarga de pressão nos tempos avaliados. Os dados desta tese corroboram outro estudo do nosso laboratório que evidenciou que as alterações cardíacas do VE apareceram apenas em estágios mais avançados da doença (LEICHSENRING-SILVA et al., 2011). Um estudo recente evidenciou que a indução com MCT, em dose inferior a que foi utilizada neste trabalho, não alterou a EF do VE mesmo após períodos prolongados, como em quatro e seis semanas de protocolo experimental (WANG et al., 2019b).

Pelos dados morfométricos e funcionais ficou claro que a HVD encontrada na segunda semana, corresponde a um mecanismo compensatório inicial para o aumento da PVR e da pós-carga. Acredita-se que a HVD, seja adaptativa, uma vez que não foram evidenciados prejuízos na função sistólica e diastólica, assim como não foi encontrada fibrose no tecido cardíaco. Sabe-se que alguns pacientes apresentam HVD adaptativa e permanecem clinicamente estáveis com o débito cardíaco normal por décadas, enquanto outros, mesmo com elevações similares nas pressões e na HVD, apresentam desenvolvimento de HVD mal adaptativa e rapidamente entram em estado de ICD descompensada (RICH et al., 2010). Acredita-se que os animais que receberam MCT, tenham desenvolvido HVD mal adaptativa após três semanas, uma vez que a mesma não foi eficaz na manutenção e adaptação da função de bomba desse ventrículo em resposta às altas pressões, pois foi encontrada disfunção sistólica e diastólica nessa janela temporal. Sabe-se ainda que a presença de fibrose enrijece o tecido cardíaco e prejudica sua função de bomba. Nesta tese, foi observado aumento na deposição de colágeno na terceira semana, no VD, sugerindo que o aumento da pós-carga crônica induziu a substituição de cardiomiócitos por tecido fibroso, contribuindo para a disfunção cardíaca contrátil. A HVD mal adaptativa normalmente é associada com a deposição de colágeno e fibrose tecidual, onde há redução na capacidade de exercício e no débito cardíaco (CAMPIAN et al., 2010; RYAN et al., 2015; VONK-NOORDEGRAAF et al., 2013). E com todas as alterações funcionais e morfométricas, encontradas no tecido cardíaco direito, acredita-se que o mesmo se encontre em uma fase descompensada de ICD, o que possivelmente explica a alta mortalidade encontrada nos animais após quatro semanas.

A presença de congestão pulmonar e hepática nos animais do grupo MCT três semanas reforça o estágio de ICD descompensada. Congestão pulmonar foi observada em estudos prévios após três semanas de administração com MCT (DOS SANTOS LACERDA et al., 2017; LIMA-SEOLIN et al., 2017; SOUZA-RABBO et al., 2008), provavelmente como resultado do espessamento interalveolar, aumento da filtração capilar e ainda, do processo inflamatório. Em relação à congestão hepática, os dados encontrados nesta tese corroboram outros estudos (DOS SANTOS LACERDA et al., 2017; FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004). Em conjunto, todas essas alterações induzidas pela administração de MCT (gerais, morfométricas, hemodinâmicas e ecocardiográficas) reforçam a instalação da HAP e ICD e caracterizam essa doença com rápida progressão e alta severidade. Importante destacar que, os tratamentos atuais da HAP não promovem atenuação das alterações no tecido cardíaco. Dessa forma, mesmo que nosso estudo não tenha utilizado nenhum tratamento, acreditamos que ele irá contribuir para a comunidade científica, uma vez que caracterizou as alterações cardíacas encontradas em diferentes estágios da HAP induzida por MCT.

7.2 ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MCT NO LEITO PULMONAR:

Ainda não estão totalmente estabelecidos os mecanismos envolvidos na gênese e progressão da HAP. A literatura atual se concentra na análise da doença em estágio avançado. Dessa forma, através desta tese, buscamos também caracterizar as alterações pulmonares ao longo da progressão da doença (Tabela 4), a fim de melhorar a compreensão sobre os diferentes fatores envolvidos nesta patologia.

Tabela 4. Alterações pulmonares induzidas pela administração de MCT

Parâmetros	MCT 1 semana	MCT 2 semanas	MCT 3 semanas
Parâmetros histológicos			
Extensão de dano	Aumentou	Não alterou	Não alterou
Neutrófilos	Não alterou	Não alterou	Não alterou
Linfócitos	Não alterou	Não alterou	Não alterou
Deposição de colágeno	Não alterou	Não alterou	Aumentou
Espessura da camada média	Não alterou	Não alterou	Aumentou
Nitrotirosina	Leve-acentuada	Leve-moderada	Leve-acentuada
Análises Bioquímicas			
Atividade NADPH	Aumentou	Não alterou	Não alterou
Concentração ROS	Aumentou	Não alterou	Aumentou
Atividade SOD	Aumentou	Não alterou	Aumentou
Atividade CAT	Não alterou	Reduziu	Não alterou
Atividade GPx	Não alterou	Não alterou	Não alterou
Sulfidrilas	Não alterou	Não alterou	Reduziu
TBARS	Não alterou	Não alterou	Aumentou
Atividade TrxR	Aumentou	Não alterou	Aumentou

Continuação da tabela 4. Alterações pulmonares induzidas pela administração de MCT

Parâmetros	MCT 1 semana	MCT 2 semanas	MCT 3 semanas
Atividade GR	Reduziu	Não alterou	Não alterou
Atividade NOS	Não alterou	Aumentou	Aumentou
Atividade elastase	Não alterou	Não alterou	Reduziu
Atividade collagenase	Não alterou	Não alterou	Reduziu
Análises Moleculares			
Expressão da XO	Não alterou	Não alterou	Não alterou
Expressão SOD-2	Não alterou	Reduziu	Aumentou
Expressão Trx-1	Aumentou	Reduziu	Reduziu
Expressão VDUP-1	Aumentou	Aumentou	Aumentou
Expressão Nrf2	Não alterou	Reduziu	Reduziu
Razão Akt	Não alterou	Aumentou	Aumentou
Razão JNK e p38	Não alteraram	Não alteraram	Não alteraram
Expressão Caspase 3 clivada	Não alterou	Aumentou	Não alterou
Expressão NF- κ B65	Não alterou	Aumentou	Aumentou
Expressão HSP70	Não alterou	Reduziu	Reduziu
Expressão eNOS	Aumentou	Não alterou	Reduziu
Razão ETAR/ETBR	Não alterou	Não alterou	Aumentou
Reatividade vascular da artéria pulmonar			
Resposta à Ach	Não alterou	Reduziu	Reduziu
Resposta à Phe	Não alterou	Reduziu em algumas doses	Não alterou

Sabe-se que uma das principais características da HAP é o espessamento da túnica média dos vasos pulmonares. Essas mudanças morfológicas correspondem à marca registrada da doença, tanto em humanos quanto em animais, sendo responsáveis pelo aumento da PVR e desenvolvimento de ICD (LAI et al., 2014; LAU et al., 2017; SILVA et al., 2019; YAN et al., 2019). A presença de espessamento acentuado da camada média encontrada nesta tese, na terceira semana, reforça a presença de um remodelamento vascular pulmonar obstrutivo e a instalação da HAP. Acreditamos que esse remodelamento seja resultante das alterações bioquímicas e moleculares encontradas nesses animais, uma vez que se sabe que esses fatores induzem a proliferação e o remodelamento vascular pulmonar. Além do mais, nosso achado

corroborar a literatura atual, onde foi evidenciado aumento da espessura da camada média em estágios tardios da HAP (CHRISTOU et al., 2012; SHI et al., 2018).

Um dos mecanismos envolvidos no remodelamento vascular pulmonar que ocorre na HAP é a disfunção endotelial. Tanto modelos animais quanto pacientes com HAP apresentam disfunção endotelial (FUJI et al., 2016; GIAID; SALEH, 1995; LAI et al., 2014; MORRELL et al., 2009), que implica em um desequilíbrio na produção, pelas células endoteliais, de vasodilatadores e vasoconstritores, ativadores e inibidores da proliferação e migração de células de músculo liso vascular, mediadores pró-trombóticos e anti-trombóticos e sinais anti-inflamatórios e pró-inflamatórios (MORRELL et al., 2009). Os principais vasomediadores dependentes do endotélio correspondem à ET-1 e ao NO.

Neste estudo, encontramos que a administração de MCT induziu, no parênquima pulmonar, aumento na razão ETAR/ETBR na segunda e na terceira semana de doença. O aumento nessa razão sugere que esses animais apresentam maiores níveis de ET-1, e que devido à maior expressão do ETAR, culminem na acentuação da proliferação e da constrição vascular, contribuindo para o remodelamento vascular pulmonar e aumento da PVR. Enquanto que, em modelos experimentais, o aumento nos níveis de ET-1 foi relacionado com a patologia da HAP (MIYAUCHI et al., 1993), estudos clínicos apresentaram correlações entre os altos níveis de ET-1 com aumento da PVR, alterações estruturais nos vasos pulmonares e, ainda, com a sobrevida dos pacientes (GIAID et al., 1993; PARIKH et al., 2016; STEWART et al., 1991; VIZZA et al., 2013). Pacientes com HAP idiopática ou HAP hereditária apresentaram redução do ETBR, reforçando um papel vasoconstritor e proliferativo da ET-1 (YU et al., 2013). Acredita-se que esses maiores níveis de ET-1 não sejam apenas uma consequência do aumento da sua síntese, mas também da redução da sua depuração. Além disso, alterações nos receptores da ET-1 também já foram descritas no modelo de MCT, incluindo aumento da ativação de ETAR (CHANG et al., 2018; DE LIMA-SEOLIN et al., 2018) e redução da ativação do ETBR (DAVIE et al., 2002; DE LIMA-SEOLIN et al., 2018) após 3 semanas de indução com MCT. No entanto, é importante ressaltar que esses estudos apresentam essas alterações em momentos avançados da doença, reforçando a relevância do nosso estudo através de uma análise temporal e progressiva.

Relacionado a esse desequilíbrio no metabolismo da ET-1, a redução da disponibilidade de NO, tanto em humanos quanto em modelos animais, está relacionada com uma menor resposta vasodilatadora e é encarada como uma das principais alterações

patológicas da HAP (OZTURK; UMA, 2010). Acredita-se que, em situações fisiológicas normais, o NO é incessantemente produzido, indicando uma taxa equilibrada entre produção e consumo ou eliminação. No nosso estudo, foi encontrado aumento da expressão da eNOS na primeira semana e redução da sua expressão na terceira semana após a indução com MCT. A literatura ainda não apresenta um consenso sobre os níveis da eNOS na HAP, uma vez que é possível encontrar aumento, diminuição ou ausência de modificação desses níveis (GIAID; SALEH, 1995; MASON et al., 1998; ZHAO et al., 2009; ZIMMER et al., 2017), o que dificulta a discussão do nosso resultado. Avaliamos também a atividade da NOS, que corresponde à análise da atividade das três isoformas dessa enzima (eNOS, iNOS e nNOS). Neste estudo, encontramos aumento da atividade da NOS no tecido pulmonar após duas e três semanas de indução com MCT. Esses resultados sugerem duas linhas de pensamento; primeiro que há produção constante de NO, inicialmente pela eNOS e, posteriormente, pelas demais isoformas da NOS; segundo, que o aumento da expressão da eNOS e da atividade da NOS não significa de fato que estas estejam produzindo NO, uma vez que é possível que essas enzimas se encontrem em seus estados desacoplados, onde há liberação simultânea de ânion superóxido e NO. Além disso, é possível que o aumento da atividade da NOS resulte do aumento da isoforma iNOS, que é ativada em condições inflamatórias e difere das demais isoformas pela alta produção de NO, resultando na sua atividade citotóxica que envolve a formação de ONOO⁻. Ainda, é possível que a maior ativação do receptor ETAR da ET-1 medeie o desequilíbrio no metabolismo do NO, uma vez que este promove estimulação da produção de ROS, consumo oxidativo do NO (através da interação com o ânion superóxido), efeito inibidor direto na eNOS e regulação positiva da expressão da iNOS (WEDGWOOD et al., 2001). É possível, também, que a menor ativação do ETBR contribua para redução de NO uma vez que há menor indução da formação de NO pela eNOS exercida por esse receptor (LING et al., 2004; SILVIO GUTKIND, 1998).

Por termos encontrado alteração na expressão da eNOS e na atividade da NOS e sabendo que o NO pode interagir com o ânion superóxido e induzir a formação de ONOO⁻, investigamos diferentes fontes de ROS, incluindo a atividade de NADPH oxidase e a expressão da xantina oxidase (XO). Encontramos que, no tecido pulmonar, a NADPH oxidase parece ser responsável pela elevação nos níveis de ânion superóxido encontrados na primeira semana após a indução com MCT, uma vez que nenhuma alteração foi observada na expressão da XO. Associado a isso, maior expressão de eNOS também foi encontrada na

primeira semana, sugerindo assim, maior interação entre o ânion superóxido e NO, formado nesse período.

Para confirmarmos essa teoria, avaliamos a marcação indireta de ONOO⁻ usando o anticorpo da nitrotirosina, o qual, quando induz coloração marrom na lâmina em estudo, reflete a presença de ONOO⁻. Neste estudo, evidenciamos marcação leve à acentuada na primeira semana, leve à moderada na segunda semana e, leve à acentuada na terceira semana após a indução com MCT, inferindo assim, maior formação de ONOO⁻ nas fases iniciais e avançadas da doença. Níveis elevados de ONOO⁻ foram encontrados tanto em modelos experimentais (KAMEZAKI et al., 2008), quanto em estudos clínicos com pacientes com HAP severa (BOWERS et al., 2004; ZHAO et al., 2009). Esses estudos apresentam apenas um estágio da doença (grave), mas dados desta tese reforçam a importância de alterações precoces do estresse nitrosativo na doença. Além disso, sabe-se que o ONOO⁻ é capaz de promover a depleção de cofatores para síntese do NO, como o BH₄, inibir a eNOS (PALL, 2007; WEDGWOOD et al., 2001) e, com isso gerar um ciclo vicioso que resulta na formação de mais ONOO⁻. Esses efeitos do ONOO⁻ podem ter ocorrido, uma vez que foi observada maior formação de ONOO⁻ nesses estágios e redução da expressão da eNOS na terceira semana.

O aumento de fontes de espécies reativas é corroborado pelo aumento observado na concentração de ROS totais na primeira e na terceira semana do protocolo experimental no parênquima pulmonar dos animais doentes, neste estudo.

Para proteger contra o excesso de ROS/RNS, as células contam com importantes sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que normalmente atuam cooperativamente para evitar o estresse oxidativo (AGGARWAL et al., 2013). A primeira linha de defesa celular contra ânion superóxido e formação de ONOO⁻, corresponde à enzima superóxido dismutase (SOD), que remove o ânion superóxido por conversão em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que por sua vez, pode ser removido pela catalase (CAT), pela glutathiona peroxidase (GPx) ou outras peroxidases.

Neste estudo, evidenciamos que a administração de MCT promoveu aumento da atividade da SOD na primeira e na terceira semana de protocolo experimental. Estudos anteriores apoiam a ideia de que a SOD aumenta a biodisponibilidade de NO por eliminar o ânion superóxido, resultando em um prolongamento de seu efeito benéfico. Acreditamos que

essa alta atividade da enzima corresponda a uma tentativa de minimizar a formação de ânion superóxido, através do aumento da atividade da eNOS e NADPH oxidase na primeira semana, e do aumento da atividade da NOS e formação de ROS totais na terceira semana. Isso porque se sabe que níveis elevados de ânion superóxido podem interferir na regulação do tônus vascular mediada pelo NO, uma vez que este pode inibir a atividade do NO como vasodilatador. Mesmo em situação fisiológica, as mitocôndrias correspondem a uma fonte de ROS. Normalmente, a maioria dos elétrons que fluem através da cadeia respiratória são reduzidos a água; no entanto, alguns vazam dos complexos I e III e reagem com o oxigênio para produzir ânion superóxido (LAI et al., 2014). Para contrabalancear essa produção, o ânion superóxido é convertido em H₂O₂ pela superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), e por isso analisamos a expressão molecular dessa enzima. Assim, durante a segunda semana do protocolo experimental, com redução da expressão da SOD2, é possível que a administração de MCT tenha induzido disfunção na cadeia transportadora de elétrons, induzindo aumento de produção de ânion superóxido. Sabe-se que essa disfunção mitocondrial pode contribuir para necrose e apoptose (WOLIN; AHMAD; GUPTE, 2005), além de contribuir para a troca do metabolismo oxidativo para a glicólise anaeróbia e, dessa forma, culminar na vasoconstrição das células musculares lisas (GUIGNABERT et al., 2013). Dessa forma, na terceira semana, o aumento da expressão da SOD2 induzido pela administração de MCT parece ser uma tentativa adicional de evitar o estresse oxidativo celular.

Outra importante linha de defesa antioxidante analisada neste estudo foi a enzima CAT. Neste estudo, a MCT induziu redução da sua atividade na segunda semana do protocolo experimental. Essa redução pode ter ocorrido por dois motivos. Primeiro, que como foram observados níveis elevados de ROS e na atividade de SOD na primeira semana, sugerindo aumento de ânion superóxido e formação de H₂O₂, é possível que a atividade da CAT tenha sido elevada previamente ao momento de análise justamente para neutralizar seu substrato (H₂O₂). Segundo, sabendo que a CAT corresponde a uma enzima que contém grupamento heme na sua estrutura, e que o NO tem efeito direto, através de uma ligação reversível, em proteínas que contêm grupo heme (DEISSEROTH; DOUNCE, 1970; SCHENKEL et al., 2012) é possível que o NO tenha exercido uma modulação reversível e inibitória sobre a CAT, na segunda semana do protocolo experimental.

Outra linha de defesa avaliada neste estudo foi a GPx. A indução com MCT não promoveu alteração na atividade dessa enzima antioxidante responsável pela detoxificação de

peróxidos orgânicos e inorgânicos. Sabe-se que a atividade da GPx é dependente da glutathiona reduzida (GSH) que é oxidada e forma glutathiona oxidada (GSSG), enquanto que os níveis de GSH são mantidos pela atividade da glutathiona redutase (GR), através da redução de GSSG em GSH por meio da oxidação do NADPH proveniente do ciclo das pentoses. Como não foi observada alteração na atividade da GPx, é possível que esse sistema se manteve em níveis normais ao longo da progressão da doença. A literatura apresenta resultados controversos em relação à atividade da GPx. Por exemplo, aumento (DE LIMA-SEOLIN et al., 2018b) e redução (TÜRCK et al., 2020) da atividade de GPx foi encontrado em pulmão de ratos que receberam MCT após três semanas, enquanto redução foi evidenciada no tecido pulmonar de pacientes com HAP e ICD (MASRI et al., 2008), dificultando a discussão dos nossos resultados.

Além disso, avaliamos as concentrações de um antioxidante-não enzimático. Neste estudo, encontramos redução no teor de sulfidrilas no parênquima pulmonar na terceira semana do protocolo experimental em resposta a administração de MCT. Como explicação para essa redução, é possível que o NO tenha sido nitrosilado (GOW et al., 2004), ou seja, se ligado às sulfidrilas, processo este altamente reversível envolvido na sinalização celular. Associado a isso, foi observado aumento do dano oxidativo a lipídios na terceira semana do protocolo experimental nos animais que receberam MCT. Como os lipídios se encontram principalmente nas membranas celulares, a presença de dano oxidativo a lipídios induz modificações nessas estruturas, que resulta em alterações na fluidez e na permeabilidade, comprometendo assim, funções biológicas básicas. Nosso estudo corrobora outros achados na literatura, uma vez que aumento de lipoperoxidação foi observado previamente em pulmão de ratos expostos à MCT após três semanas (AHMED et al., 2014). Dessa forma, a redução de sulfidrilas e de CAT pode ter contribuído para esse desequilíbrio nos níveis de ROS/RNS, induzindo dano oxidativo.

Sabe-se ainda que as alterações nas concentrações de ROS podem interferir na ativação de vias de sinalização envolvidas em processos fisiológicos essenciais, incluindo proliferação e morte celular. Além dos antioxidantes citados previamente, a tiorredoxina-1 (Trx-1) tem importante função na manutenção da homeostase redox celular, por promover a interação de proteínas oxidadas com seu centro ativo redox. Além disso, junto com seu papel como um eliminador de espécies reativas, a Trx-1 pode afetar diretamente algumas proteínas de sinalização intracelular, modulando cinases e fatores de transcrição envolvidos no

crescimento e na morte celular programada (CHEN et al., 2014; LEE; KIM; LEE, 2013; MAHMOOD et al., 2013; YAMAWAKI; HAENDELER; BERK, 2003).

Neste estudo, acreditamos que o aumento da expressão da Trx-1 e da atividade da TrxR encontrados na primeira semana após indução com MCT, tenha sido uma resposta ao aumento de ROS observado neste estágio inicial da doença, como tentativa de converter Trx-1 oxidada para sua forma reduzida. Pode-se hipotetizar ainda que os maiores níveis de ROS encontrados no presente estudo poderiam mediar uma indução do sistema Trx durante esse estágio inicial da HAP, uma vez que o sistema da GSH esteve reduzido durante esse período. Curiosamente, após duas semanas da injeção de MCT, foi encontrada redução na expressão de Trx-1 e níveis normais na atividade da TrxR e da GR. A redução da expressão da Trx-1 e o aumento da atividade da TrxR pode ser resultado do aumento na concentração pulmonar de ROS após três semanas. Outro fator que pode ter contribuído para a redução da expressão da Trx-1 foi o aumento da expressão do seu inibidor endógeno, VDUP-1, em todos os tempos avaliados. Quando presente em altas concentrações o VDUP-1 deixa as células mais vulneráveis a vários estresses, incluindo o estresse oxidativo e nitrosativo, o que pode refletir nas alterações encontradas nesta tese. Associado a isso, é possível que a redução da expressão do Nrf2 após duas e três semanas nos animais que receberam MCT tenha contribuído para a redução da expressão da Trx-1 e de outros antioxidantes nesses tempos, uma vez que se sabe que este corresponde a um importante fator do controle da homeostase redox celular, através da regulação da expressão basal e induzível de inúmeros antioxidantes (CEBULA; SCHMIDT; ARNÉR, 2015).

Sabe-se também que o desenvolvimento de HAP está intimamente associado à transdução de vias de sinalização como a da Akt, que corresponde a uma cinase anti-apoptótica que é ativada por fosforilação e que tem papel central na proliferação celular, ativação celular e angiogênese. Neste estudo, o desenvolvimento de HAP promoveu aumento na ativação da Akt no tecido pulmonar na segunda e na terceira semana do protocolo experimental, sugerindo um perfil proliferativo nesses animais. Estudos experimentais de HAP demonstraram aumento na ativação da Akt tanto em modelo de MCT (RAVI et al., 2013; SILVA et al., 2019; WANG et al., 2012), quanto em modelo de shunt da veia jugular e artéria carótida (MA et al., 2017) e relacionaram com a proliferação e espessamento vascular pulmonar, sendo que os diferentes tratamentos abordados, através da inibição da via da Akt, promoveram atenuação da doença. Nesta tese, um dos mecanismos que pode ter modulado a

ativação da Akt pode ter sido o aumento de ET-1/ETAR. A ativação de ETAR pela ET-1 promoveu a migração e a invasão de células de carcinoma hepatocelular via ativação das vias de sinalização envolvendo, entre outros, a Akt (CONG et al., 2016). Mesmo que esse mecanismo tenha sido pouco explorado na HAP, sugerimos aqui que possa estar envolvido, uma vez que foi encontrado aumento da expressão do ETAR e da Akt ativada, principalmente em fases avançadas da doença. Além disso, a redução da Trx-1 e o aumento de ONOO⁻ encontrados nesses animais, poderia ter resultado na menor ativação do inibidor da Akt, o homólogo de fosfatase e tensina, e, conseqüentemente, induzido ao aumento da ativação da Akt aqui observado. No entanto, essa hipótese não foi testada.

Além de alterar vias pró-sobrevivência, a concentração de ROS também pode modular cascatas apoptóticas (CIRCU; AW, 2010). Mesmo que tenhamos observado aumento na concentração de ROS na primeira e na terceira semana, neste estudo, a administração de MCT não promoveu alterações nas expressões de JNK e p38 no tecido pulmonar. Sabe-se que JNK e p38 são proteínas pertencentes à família das proteínas cinases ativadas por mitógeno, responsáveis pela regulação da apoptose, que podem ser estimuladas na presença de níveis elevados de ROS e inibidas na presença de Trx-1 e Akt ativada. Mesmo que neste estudo tenhamos observado aumento de ROS na primeira e terceira semana do protocolo experimental, é possível que os baixos níveis de Trx-1 assim como, a alta ativação de Akt tenham regulado a expressão desses marcadores apoptóticos, mantendo seus níveis normais.

Associado a isso, sabe-se que a concentração de ROS também pode modular a atividade das caspases (CIRCU; AW, 2010), que correspondem a um grupo de proteases essenciais para o processo de apoptose. Neste estudo, avaliamos a expressão da caspase-3, conhecida por ser uma caspase efetora, ou seja, responsável pela clivagem de substratos proteicos da célula, resultando no processo apoptótico. Observamos aumento na expressão desta caspase na segunda semana após a indução com MCT, sem alteração nas demais janelas temporais. Por mais que não tenhamos avaliado outros componentes dessa via, é possível que essa ativação tenha ocorrido em resposta ao maior estresse oxidativo intracelular. Acreditamos que o aumento da expressão da caspase-3 tenha gerado pouco efeito, uma vez que foi observado, no mesmo período, aumento da ativação de Akt e do NF- κ B65, fatores conhecidos por sua potente ação anti-apoptótica (ABBASPOUR BABAEI et al., 2017; LUO et al., 2003), contribuindo assim para o aumento do espessamento da camada média na terceira semana após a indução com MCT. No modelo de MCT, após quatro semanas, foi

encontrado aumento de Akt ativada, sem alteração de caspase 3 e aumento de Bcl-2 (SILVA et al., 2019). Dessa forma, percebe-se que a HAP se caracteriza, principalmente, por proliferação exacerbada de células, via ativação da Akt e resistência à apoptose, o que contribui para o espessamento vascular pulmonar.

Outro mecanismo envolvido na fisiopatologia da HAP induzida pela MCT é a presença de inflamação. Por meio da análise histológica, foi mensurada a extensão do dano ao parênquima pulmonar. Através dessa análise, foi observado que a MCT aumentou significativamente o dano na primeira semana do protocolo experimental, reforçando o efeito tóxico direto dos metabólitos ativos da MCT no tecido pulmonar. Além disso, a fim de caracterizar o perfil inflamatório envolvido nessa patologia, quantificamos, via histologia, dois tipos de células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos), nos diferentes grupos experimentais. Por mais que a MCT pareceu induzir um aumento nessas células, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos experimentais. Por isso acreditamos que outras células podem estar participando desse processo. Caslin e colaboradores e Savai e colaboradores reconheceram os mastócitos como importante grupo celular envolvidos nesses achados estruturais na HAP (CASLIN et al., 1990; SAVAI et al., 2012).

Outra análise realizada neste estudo para verificar a presença de inflamação foi por meio da quantificação da expressão do NF- κ B p65. Neste estudo, a indução com MCT promoveu aumento na ativação desse fator nuclear após duas e três semanas. Estudos sugerem que a regulação positiva da via de sinalização do NF- κ B pode promover a proliferação celular e o remodelamento vascular pulmonar na HAP (YAN et al., 2019). Como parte da via de sinalização do NF- κ B, o NF- κ B p65 está tipicamente envolvido na resposta inflamatória do corpo. Dessa forma, é possível que a ativação exacerbada de NF- κ B p65 levou à indução de iNOS e de citocinas inflamatórias, uma vez que estudos têm apontado para uma conversa cruzada entre esses fatores. Ainda, é sabido que a ET-1 gera ativação de NF- κ B p65, que, por sua vez, leva à ativação de iNOS (CIANFROCCA et al., 2010), sugerindo, assim, um efeito somatório desses diferentes mecanismos. Como nesse estudo evidenciamos aumento de NF- κ B p65 na segunda e na terceira semana, acreditamos que esse possa contribuir para o aumento da atividade da NOS encontrada nesse mesmo período (e vice-versa), levando ao aumento do dano e de formação de ONOO⁻. Na terceira semana, com o aumento de ET-1, culminando no aumento de ONOO⁻ também pode haver estímulos para induzir o NF- κ B p65. Dessa forma, acreditamos que esses fatores estejam promovendo um ciclo vicioso que

culmina em aumento de inflamação, redução de NO e progressão da doença. Além disso, foi encontrado que a redução de NF- κ B p65 desencadeou atenuação da HAP induzida por MCT (YAN et al., 2019), reforçando o papel central deste fator na progressão da doença.

Estudos *in vivo* sugerem, ainda, uma interação inibitória entre Nrf2 e NF- κ B p65. Enquanto em condições normais essas vias interagem de forma complementar, parece que, neste estudo, a estimulação do NF- κ B p65 se destacou, uma vez que sua expressão foi aumentada após duas e três semanas de indução com MCT. Essa interação negativa entre esses dois fatores pode ser devida à competição de NF- κ B p65 ativo com o Nrf2 no núcleo ou pela modulação direta através da interação da região N-terminal da subunidade NF- κ B p65 com Keap1, inibindo a atividade de Nrf2 (AHMED et al., 2017; YU et al., 2011). Além disso, o aumento do NF- κ B p65 pode ter ocorrido em resposta ao menor efeito inibitório da HSP70, bem como devido ao aumento da ativação da Akt observada nesses animais.

Como possível consequência dessas alterações, foi observado acúmulo de tecido conjuntivo fibrótico no tecido pulmonar dos animais do grupo MCT 3 semanas, em relação ao seu grupo controle. Nesse caso, essa fibrose é caracterizada pelo acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular, incluindo colágenos, fibronectina e ácido hialurônico no local da lesão do tecido. Acreditamos que o desenvolvimento de fibrose no tecido pulmonar tenha contribuído para a redução da complacência pulmonar, redução nas trocas gasosas, enrijecimento arterial pulmonar e, conseqüentemente para o aumento da mPAP. Essas alterações pulmonares normalmente são associadas com sintomas comuns da HAP como a dificuldade de respirar e fadiga. Aumento na síntese de colágeno e elastina foi evidenciado em estudos com modelos experimentais, incluindo MCT e hipóxia, enquanto que a fibrose pulmonar foi encontrada após 4 semanas de indução com MCT (SHI et al., 2018), reforçando ser uma alteração relacionada com estágios avançados da doença, uma vez que não encontramos aumento nas fases iniciais. Além disso, estudos utilizando tratamentos com respostas anti-fibróticas têm evidenciado atenuação da doença e inferindo um papel central para a fibrose nessa doença (SHENOY et al., 2010).

Sabe-se que em situações normais, a renovação metabólica do colágeno e da elastina é considerada baixa em animais adultos. Neste estudo, avaliamos a atividade das enzimas colagenase e elastase para verificar o seu papel nesse processo. Ambas enzimas apresentaram redução da sua atividade na terceira semana do protocolo experimental nos animais que receberam MCT. Estudos avaliando a atividade elastolítica foram realizados em artérias

pulmonares onde foi encontrado um papel central para o aumento da atividade elastolítica e número de quebras na lâmina elástica interna em fases precoces da doença (dois e quatro dias após a indução com MCT, respectivamente), ou seja, previamente ao espessamento da camada média dos vasos pulmonares. Ainda, o aumento da atividade elastolítica também foi encontrado 28 dias após a indução com MCT (TODOROVICH-HUNTER et al., 1992; ZHU et al., 1994). Enquanto o aumento inicial pode estar relacionado ao início das alterações vasculares pulmonares, a elevação nos estágios mais tardios pode refletir doença potencialmente irreversível. Acreditamos que essa discrepância entre os nossos resultados e os estudos da literatura se devam aos diferentes tecidos utilizados, visto que em nosso estudo utilizamos todo o homogeneizado pulmonar, diferente dos estudos anteriores citados que utilizaram artérias pulmonares isoladas. Em relação à atividade da colagenase, a literatura apresentou um artigo que mostrou que o conteúdo de colágeno e elastina aumentou nas artérias pulmonares de ratos expostos a hipóxia, enquanto a atividade colagenolítica não se alterou (POIANI et al., 1990). Acreditamos assim, que nesta tese, a menor atividade das enzimas tenham contribuído para o acúmulo de tecido conjuntivo encontrado no tecido pulmonar desses animais.

Para determinar se a exposição à MCT e subsequente desenvolvimento de HAP induziu alterações no relaxamento e contração dependentes do endotélio, verificamos a resposta da artéria pulmonar à Ach e à Phe, utilizando o aparelho banho de órgãos. O desenvolvimento de HAP promoveu redução do relaxamento induzido por Ach na artéria pulmonar dos animais após duas e três semanas. Sabe-se que a Ach induz vasodilatação através de um efeito indireto sobre as células endoteliais vasculares por liberar NO (MONCADA; HIGGS, 2006). Estudos mostraram que modelos experimentais de HP, incluindo MCT e hipóxia, promoveram redução do relaxamento vascular induzido por Ach em estágios avançados da doença (3, 4 ou 5 semanas) (ABSI et al., 2019; CHRISTOU et al., 2012; MAM et al., 2010; SHI et al., 2018; VARSHNEY et al., 2016). Um estudo avaliando o efeito da MCT após quatro semanas evidenciou que a mesma promoveu redução da responsividade da artéria pulmonar à Ach quando comparado com os animais do grupo controle (SHI et al., 2018). Porém, estudos avaliando as fases iniciais da doença são escassos e dificultam a discussão. Encontramos dois estudos que avaliaram esses estágios da doença, mas que utilizaram doses maiores de MCT para indução da HAP. Enquanto o estudo de Altieri e colaboradores avaliou a reatividade vascular após 4, 7 e 14 dias de indução com MCT (105mg/kg), o estudo de Fullerton e colaboradores avaliou a reatividade vascular após

2, 7 e 14 dias de indução com MCT (100 mg/kg). Ambos estudos, no entanto, encontraram menor responsividade aos vasorelaxantes aplicados, incluindo Ach, apenas aos 14 dias (ALTIERE; OLSON; GILLESPIE, 1986; FULLERTON; HAHN; MCINTYRE, 1996). Percebe-se, assim, que, mesmo utilizando dose mais baixa de MCT, nosso achado apresenta a mesma resposta em relação ao relaxamento induzido por Ach que estes estudos citados.

Acreditamos que o menor relaxamento induzido pela Ach, nos animais MCT, após duas e três semanas, deva-se ao somatório dos seguintes fatores: presença de estresse oxidativo, disfunção endotelial (com diminuição da disponibilidade de NO), remodelamento estrutural da parede vascular pulmonar e deposição de colágeno. Estudos evidenciaram que o remodelamento contribui para a menor resposta a vasodilatadores devido à troca do fenótipo contrátil dessas células para um fenótipo sintético (CHRISTOU et al., 2012; MAM et al., 2010). Esta possibilidade é apoiada por relatos de que a utilização de diferentes vasoativos (com diferentes mecanismos de ação) proporcionou um prejuízo na resposta relaxante, sugerindo que provavelmente não seja somente pela redução dos receptores de Ach ou redução da atividade da NOS, porque, quando utilizado o nitroprussiato de sódio (doador de NO), houve também redução do relaxamento nesses animais. Além disso, pode ser que haja uma maior atividade da fosfodiesterase 5 ou ainda, redução da proteína quinase G. Outro potente contribuinte para o remodelamento vascular, incluindo a proliferação das células musculares lisas é a inflamação, que neste estudo esteve presente no parênquima pulmonar dos animais que receberam MCT. Um estudo recente evidenciou que a redução da inflamação e, conseqüentemente do remodelamento vascular pulmonar em animais expostos a MCT, foi um dos mecanismos envolvidos na melhora do relaxamento vascular (VARSHNEY et al., 2016), reforçando o papel da inflamação na alteração da responsividade vascular. Ainda, a produção exacerbada de ROS e RNS também pode influenciar nessa menor responsividade vascular, uma vez que essas espécies reativas interferem em processos de proliferação celular, disfunção endotelial, inflamação e na deposição de colágeno. Por mais que não tenhamos realizado análises para confirmar a presença de estresse oxidativo e disfunção endotelial na artéria pulmonar, encontramos importante papel para esses mecanismos na progressão das alterações pulmonares, sugerindo assim que algumas dessas alterações também possam estar ocorrendo nos vasos pulmonares.

O relaxamento diminuído observado após a instalação da HAP experimental pode contribuir para a perda de eficácia do tratamento com vasodilatadores. Sabe-se que muitos

pacientes acabam tornando-se resistentes e não respondem ao tratamento, possivelmente devido ao remodelamento vascular pulmonar excessivo. Ainda, essas alterações podem ser determinantes na regulação local do tônus vascular pulmonar e possivelmente para prevenção da formação de trombos. Assim, nosso estudo torna-se relevante, pois mostra as alterações encontradas em estágios precoces, intermediários e avançados da doença, auxiliando na compreensão dos mecanismos envolvidos e sugerindo janelas temporais para aplicação das terapias.

Nesta tese, encontramos, ainda, redução na contratilidade vascular em resposta a algumas concentrações de fenilefrina nos animais MCT duas semanas. Sabe-se que a fenilefrina é um vasoconstritor de ação direta, através de segundos mensageiros, ativação da fosfolipase C, aumento de inositol trifosfato e diacilglicerol, com consequente aumento de cálcio. Altieri e colaboradores evidenciaram um aprimoramento na contratilidade vascular após quatro dias da indução com MCT e uma significativa redução na contratilidade, principalmente em resposta à angiotensina-II, após 14 dias (ALTIERE; OLSON; GILLESPIE, 1986). Quando procuramos trabalhos com a mesma dose de MCT aqui utilizada, estudos mostraram que os modelos de MCT ou hipóxia causaram uma redução significativa na contração dependente da concentração de fenilefrina em anéis de artéria pulmonar em estágios tardios da HAP (por exemplo, após 4 semanas) (CHRISTOU et al., 2012). Dessa forma, nossos resultados reforçam que as alterações começam mais cedo.

Todas essas alterações associadas parecem contribuir para o remodelamento vascular pulmonar, progressão e agravamento da doença, culminando em sobrecarga de pressão para o VD.

7.3 ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MCT NO TECIDO CARDÍACO

Ainda não se sabe exatamente quais são os mecanismos envolvidos na progressão das alterações cardíacas induzidas pela HAP e que resultam no desenvolvimento de ICD. No entanto, alguns estudos têm demonstrado associação entre marcadores de estresse oxidativo e alterações que acompanham o remodelamento do VD (deterioração de cardiomiócitos, fibrose perivascular e dilatação cardíaca) (BORCHI et al., 2010; MIKHAEL et al., 2019). Devido à

escassez de dados na literatura em estágios precoces e, em conjunto com a necessidade de avaliar o ambiente oxidativo e antioxidante de forma abrangente e comparar as alterações ocorridas no VD e no VE, avaliamos o efeito da progressão da HAP após 1 (sem alteração cardíaca), 2 (presença de hipertrofia) e 3 (disfunção cardíaca) semanas de indução com MCT, conforme resumido na tabela 5.

Tabela 5. Alterações cardíacas induzidas pela administração de MCT

Parâmetros	MCT 1 semana	MCT 2 semanas	MCT 3 semanas
Análises histológicas			
Inflamação VD	Leve	Leve	Moderado
Inflamação VE	Ausente	Ausente	Leve
Análises Bioquímicas			
SOD VD	Não alterou	Não alterou	Reduziu
CAT VD	Aumentou	Não alterou	Não alterou
GPx VD	Não alterou	Não alterou	Aumentou
Sulfidrilas VD	Reduziu	Aumentou	Não alterou
H ₂ O ₂ VD	Aumentou	Não alterou	Não alterou
TBARS VD	Aumentou	Não alterou	Aumentou
SOD VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou
CAT VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou
GPx VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou
Sulfidrilas VE	Aumentou	Reduziu	Não alterou
H ₂ O ₂ VE	Não alterou	Não alterou	Não alterou
TBARS VE	Não alterou	Não alterou	Aumentou
Análise Espectral			
Razão HF/LF	Não alterou	Não alterou	Aumentou

Na primeira semana, a administração de MCT induziu, no VD, aumento de H₂O₂, aumento da atividade da CAT, redução de sulfidrilas e presença de dano oxidativo, mensurado via TBARS. Acredita-se que o aumento da enzima antioxidante CAT tenha ocorrido em consequência do aumento do seu substrato, o H₂O₂. Ao mesmo tempo, redução de sulfidrilas e aumento de TBARS foram evidenciados, sugerindo que a menor concentração de sulfidrilas tenha reduzido a proteção antioxidante contra os efeitos de ruptura de membranas causados por oxidação lipídica. No VE, as alterações foram mais brandas na primeira semana, apresentando apenas aumento nas sulfidrilas.

A segunda semana foi marcada por um padrão oposto na concentração de sulfidrilas. Enquanto o VD apresentou aumento nas sulfidrilas, o VE apresentou redução, sugerindo uma possível interação entre as câmaras cardíacas. Palace e colaboradores evidenciaram que as concentrações de antioxidantes como vitamina C e E eram baixas no tecido cardíaco após um estímulo patológico, como o infarto agudo do miocárdio, havendo mobilização de antioxidantes de outros reservatórios corporais para o coração (PALACE et al., 1999). Dessa forma, acredita-se que uma compensação e redistribuição de antioxidantes (sulfidrilas) entre os ventrículos possa estar acontecendo, uma vez que o padrão oposto foi encontrado durante a primeira e segunda semanas após a indução com MCT. Um dos mecanismos sugeridos que podem estar mediando essa mobilização de antioxidantes entre tecidos, poderia ser através de vesículas extracelulares que contém exossomos. Essas vesículas, de tamanho nanométrico, são conhecidas por apresentarem uma habilidade inata para servir como veículos de comunicação, apresentando a capacidade de mediar a informação célula-célula e entre os tecidos, impactando diretamente a expressão gênica na célula receptora e o fenótipo celular (AILAWADI et al., 2015; ALIOTTA et al., 2016), mecanismo que pode estar envolvido no suprimento de sulfidrilas durante a segunda semana no VD e que pode ter auxiliado na manutenção do balanço redox durante este estágio da doença. Esta hipótese, porém, necessitaria ser testada.

A progressão da doença promoveu, no VD, redução da atividade da SOD, aumento da atividade da GPx e aumento de dano lipídico mensurado via TBARS após três semanas. A redução da atividade da SOD pode ter ocorrido em consequência de um meio intracelular mais oxidado devido ao aumento da produção de ânion superóxido pela atividade da NADPH oxidase. Estudo recente também evidenciou redução da atividade da SOD e aumento da atividade da NADPH oxidase após três semanas de indução com MCT (DOS SANTOS LACERDA et al., 2017). Além disso, o aumento intracelular de ânion superóxido pode ter gerado aumento de H_2O_2 previamente, o que pode ter inibido a atividade da SOD e induzido aumento da atividade da GPx, que sabe-se é responsável pela conversão do H_2O_2 em H_2O e oxigênio. Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo ocorre quando a concentração de ROS excede aquela que o sistema biológico pode neutralizar, podendo oxidar moléculas, como lipídios e DNA, causando uma infinidade de efeitos prejudiciais. Neste estudo, foram encontrados níveis elevados de TBARS, após três semanas de indução com MCT no VD e no VE, sugerindo assim um dano oxidativo a lipídios nesses tecidos. Esse achado é corroborado pelo fato de que a administração de MCT promoveu aumento do dano oxidativo a lipídios no

VD, após três (DOS SANTOS LACERDA et al., 2017; MOSELE et al., 2012) e seis semanas (FARAHMAND; HILL; SINGAL, 2004; WU et al., 2017). Em relação ao aumento de TBARS no VE, acredita-se que seja uma resposta aos níveis reduzidos de sulfidrilas encontrados na segunda semana.

Dessa forma, é importante destacar que, embora em nível celular as respostas de ambos os ventrículos sejam em grande parte similares (REDDY; BERNSTEIN, 2015), percebe-se que, no estado patológico de HAP, o VD é mais suscetível ao estresse oxidativo do que o VE, mesmo que haja aumento na produção de ROS em ambos ventrículos. Isto porque no VD as defesas antioxidantes são depletadas mais precocemente, enquanto no VE permanecem intactas até um estágio mais avançado de falência, corroborando outros estudos (REDDY; BERNSTEIN, 2015; TSUTSUI; KINUGAWA; MATSUSHIMA, 2011). Desta forma, as diferenças observadas entre os ventrículos poderiam ser explicadas parcialmente, pela especificidade das respostas apresentadas por cada um dos ventrículos, sob condições de remodelamento patológico aqui observado.

Além disso, esse aumento de estresse e dano oxidativo pode ter sido associado com a presença de maiores níveis de inflamação no tecido cardíaco (Tabela 5). Sabe-se que em situações normais, as interações entre estresse oxidativo e expressão de citocinas inflamatórias apresentam um equilíbrio. No entanto, com o aumento do dano oxidativo a lipídios no VD na primeira semana, é possível que haja influência da presença de infiltrado inflamatório nesse tecido. Isso porque alguns estudos têm sugerido que oxidantes apresentam a capacidade de induzir processos inflamatórios, ao mesmo tempo que citocinas pró-inflamatórias apresentam envolvimento na cascata de eventos que levam ao aumento do estresse oxidativo (KHAPER et al., 2010), o que de fato pode estar ocorrendo no VD. Sabe-se, ainda, que a extensão da resposta depende da intensidade e duração do estímulo. Por isso nas fases iniciais e intermediárias da doença (primeira e segunda semanas do protocolo experimental) acredita-se que, com a presença de leve infiltrado inflamatório e algumas alterações no balanço redox, possa haver sinalização para alterações fenotípicas adaptativas, incluindo desenvolvimento de HVD e resposta antioxidante. No entanto, com a progressão da doença e aumento crônico da pós-carga diretamente no lado direito do coração, acredita-se que a conversa cruzada entre inflamação (agora moderada) e aumento do estresse oxidativo estejam induzindo um remodelamento patológico do VD.

Associado a isso, estudos sugerem que a inflamação representa um aspecto integral da regulação homeostática que pode contribuir para a patogênese da HAP e para o desenvolvimento da ICD. Pacientes com HAP severa apresentaram níveis elevados de marcadores pró-inflamatórios que foram associados com o baixo prognóstico de sobrevivência (HUMBERT et al., 1995; SOON et al., 2010). É importante destacar que, nas fases avançadas da doença (três semanas), foi encontrada inflamação moderada, que pode ter contribuído para a alta mortalidade na quarta semana. Nesta tese, foi observado que, após três semanas de indução com MCT, houve dano oxidativo a lipídios no VE e leve infiltrado inflamatório nessa câmara cardíaca, reforçando a possível conversa cruzada entre esses mecanismos. Assim como neste estudo, outros relatos têm evidenciado que os oxidantes têm a capacidade de induzir processos inflamatórios, por exemplo, pela ativação de fatores a jusante, como o NF- κ B, enquanto as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias têm sido implicadas na cascata de eventos que levam ao aumento do estresse oxidativo (KHAPER et al., 2010). Nosso resultado corrobora o estudo de Campian e colaboradores, que evidenciou também que o desenvolvimento de ICD é associado com a ativação inflamatória no VD, a qual contribui para o remodelamento patológico do VD (CAMPIAN et al., 2010).

Um dos mecanismos que pode ter contribuído para o desequilíbrio redox e inflamatório foi a disfunção autonômica encontrada na terceira semana nos animais que receberam MCT (tabela 5). Neste estudo, a disfunção autonômica foi caracterizada pela redução da ativação do SNP e pelo aumento da ativação do SNS, corroborando outros estudos (DA SILVA GONÇALVES BÓS et al., 2018; LIMA-SEOLIN et al., 2017; WENSEL et al., 2009).

Nesta tese, o aumento do tônus simpático encontrado na terceira semana nos animais que receberam MCT, foi correlacionado positivamente com a HVD desenvolvida nesses animais. Nosso resultado reforça achados na literatura que mostraram que o aumento do tônus simpático esteve relacionado com o prognóstico dos pacientes e com a severidade da doença (WENSEL et al., 2009). Através do uso de microneurografia, por exemplo, um estudo evidenciou aumento na descarga simpática em pacientes com HAP em relação a pessoas saudáveis, sendo que esse aumento foi diretamente correlacionado, entre outros com a classe funcional, tempo de aceleração pela artéria pulmonar e ainda, com a deterioração clínica (VELEZ-ROA et al., 2004). Além disso, sabe-se que pacientes com ICD apresentam níveis elevados de catecolaminas e resposta prejudicada para agonistas dos receptores β -

adrenérgicos, refletindo a *downregulation* e dessensibilização desses receptores (ISHIKAWA et al., 1991; SEYFARTH et al., 2000). Essa dessensibilização pode explicar porque muitos pacientes não respondem ao tratamento com inotrópicos. O aumento de infiltrado inflamatório moderado no VD e leve no VE pode ter sido parcialmente induzido pelo aumento da ativação do SNS, uma vez que se sabe que o aumento de catecolaminas circulantes leva ao desenvolvimento de necrose miocárdica e infiltrado inflamatório (BEHONICK et al., 2001).

Em contrapartida, a redução da ativação do SNP em pacientes graves, bem como em modelos experimentais já foi demonstrada (DA SILVA GONÇALVES BÓS et al., 2018; LIMA-SEOLIN et al., 2017). Usando um inibidor da acetilcolinesterase, pesquisadores propuseram que o SNP esteve relacionado à regulação adaptativa dos processos inflamatórios, uma vez que a ativação do SNP pela estimulação colinérgica reduziu a resposta inflamatória através da menor produção de citocinas pró-inflamatórias locais e sistêmicas, resultando na redução da inflamação no VD e no tecido pulmonar em modelo de HAP induzido por dose única de Sugem associada à hipóxia crônica (DA SILVA GONÇALVES BÓS et al., 2018). Esse efeito anti-inflamatório de restauração da atividade parassimpática é mediado principalmente via estimulação colinérgica através da ativação do receptor nicotínico e inibição da via do NF- κ B. Além disso, sabe-se que a redução da ativação do SNP contribui para o aumento da variabilidade de pressão arterial e que isso pode contribuir para o desenvolvimento de HVD, rigidez vascular e dano tecidual (DA SILVA GONÇALVES BÓS et al., 2018), o que pode ter ocorrido nos animais desta tese.

Assim, acreditamos que a redução da ativação parassimpática, aqui observada, seja decorrente do aumento da ativação simpática e, que a disfunção autonômica esteja intimamente relacionada com as alterações tardias observadas no VD, em resposta a sobrecarga de pressão induzida pela instalação da HAP.

8 CONCLUSÃO

A fase inicial da HAP induzida por MCT foi marcada por ativação do sistema Trx-1, sendo que, nesta fase, a via proliferativa da Akt não se mostrou ativada. Na fase intermediária, houve redução da ativação do sistema Trx-1, provavelmente devido à redução de Nrf2 e aumento de VDUP-1, sendo que as vias proliferativas, inflamatórias e apoptóticas analisadas estavam ativas. E, no estágio tardio da doença, houve aumento da atividade da TrxR, sendo mantida a ativação exacerbada da inflamação e proliferação celular, porém sem ativação da via apoptótica. Dessa forma, parece que a Trx-1 contribui para o controle do remodelamento vascular pulmonar dependente do balanço redox celular ao longo da progressão da HAP experimental. A progressão da HAP experimental foi marcada ainda pela presença inicial de estresse nitrosativo (com aumento de ROS, porém sem dano oxidativo), seguida de uma fase compensatória e, no estágio avançado da doença, pela presença de estresse oxidativo no parênquima pulmonar, com aumento de ET-1 e comprometimento acentuado da responsividade da artéria pulmonar. O desenvolvimento de HAP através da administração de MCT teve efeito direto no VD, uma vez que induziu estresse oxidativo (evidenciado pela redução de sulfidrilas e aumento de dano oxidativo) na primeira semana. Estas alterações foram acompanhadas de inflamação e HVD adaptativa na segunda semana. A progressão para a HVD mal adaptativa pareceu envolver a disfunção autonômica acentuando a conversa cruzada entre o estresse oxidativo e a inflamação na terceira semana. Em contrapartida, o VE foi pouco afetado ao longo do protocolo experimental, uma vez que apresentou inflamação leve e dano oxidativo nas fases avançadas da doença.

Conclui-se assim que a progressão da HAP induzida por MCT envolve a presença de estresse oxidativo, nitrosativo, inflamação e desequilíbrio autonômico, sendo estes mecanismos, ativados em momentos e em proporções diferentes, de acordo com os estágios da doença.

9 PERSPECTIVAS

Como perspectivas desta tese, temos:

- Avaliar o balanço redox e a disfunção endotelial na artéria pulmonar ao longo da progressão da HAP experimental;
- Verificar e caracterizar o fenótipo das células musculares lisas;
- Avaliar a disfunção mitocondrial no tecido pulmonar ao longo da progressão da HAP experimental;
- Avaliar o papel da Trx-1 na sinalização para o remodelamento adaptativo e patológico do VD em resposta a administração de MCT;
- Avaliar a expressão de mediadores importantes da sinalização celular para o remodelamento pulmonar, incluindo ASK-1 e PTEN;
- Isolar e caracterizar as vesículas extracelulares no tecido cardíaco e no soro dos animais ao longo da progressão da HAP;
- Avaliar o sistema Trx e GSH no tecido cardíaco;
- Avaliar o balanço endotelial no tecido cardíaco;
- Quantificar a concentração plasmática de BNP e correlacionar com as alterações observadas ao longo da progressão da HAP experimental.
- Realizar um mapeamento dos principais microRNAs envolvidos nos diferentes estágios da doença e em diferentes tecidos;
- Avaliar o papel do estresse oxidativo em músculos respiratórios e esqueléticos ao longo da progressão da HAP induzida por MCT.

REFERÊNCIAS:

- ABBASPOUR BABAEI, M. et al. Apoptotic induction and inhibition of NF- κ B signaling pathway in human prostatic cancer PC3 cells by natural compound 2,2'-oxybis (4-allyl-1-methoxybenzene), biseugenol B, from *Litsea costalis*: an in vitro study. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 277–294, 10 jan. 2017.
- ABSI, M. et al. Simvastatin causes pulmonary artery relaxation by blocking smooth muscle ROCK and calcium channels: Evidence for an endothelium-independent mechanism. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 1 ago. 2019.
- ACHARYA, U. R. et al. Heart rate variability: A review **Medical and Biological Engineering and Computing** Med Biol Eng Comput, , dez. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17111118/>>. Acesso em: 15 set. 2020
- AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1 jan. 1984.
- AGGARWAL, S. et al. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1011–1034, 2013.
- AHMED, L. A. et al. Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 379–387, 5 out. 2014.
- AHMED, S. M. U. et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation, **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease** Elsevier B.V., , 1 fev. 2017.
- AILAWADI, S. et al. Pathologic function and therapeutic potential of exosomes in cardiovascular disease **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease** Elsevier, , 1 jan. 2015.
- ALIOTTA, J. M. et al. Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. **Cardiovascular research**, v. 110, n. 3, p. 319–30, 2016.
- ALLEN, J. R.; CHESNEY, C. F. Effect of age on development of cor pulmonale in nonhuman primates following pyrrolizidine alkaloid intoxication. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 17, n. 2, p. 220–232, 1 out. 1972.
- ALTIERE, R. J.; OLSON, J. W.; GILLESPIE, M. N. Altered pulmonary vascular smooth muscle responsiveness in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 236, n. 2, 1986.
- ALVES, J. L. et al. Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: Results from a registry of incident Brazilian cases. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 495–501, 1 fev. 2015.
- ANDERSON, M. E. [70] Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 113, n. C, p. 548–555, 1 jan. 1985.
- AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M. R. Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant, **Frontiers in Pharmacology** Foundation, , 2014.
- ARAUJO, A. S. R. et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 249, n. 1–2, p. 133–139, 25 abr. 2006.
- ARNÉR, E. S. J.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase **European Journal of Biochemistry**, 2000.
- AUBERT, A. E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart Rate Variability in Athletes **Sports Medicine**, 2003.
- BADESCH, D. B. et al. Medical therapy for pulmonary arterial hypertension: Updated ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**, v. 131, n. 6, p. 1917–1928, 2007.

- BADESCH, D. B. et al. Pulmonary arterial hypertension: Baseline characteristics from the REVEAL registry. **Chest**, v. 137, n. 2, p. 376–387, 1 fev. 2010.
- BAGNALL, A. J. et al. Deletion of endothelial cell endothelin B receptors does not affect blood pressure or sensitivity to salt. **Hypertension**, v. 48, n. 2, p. 286–293, 1 ago. 2006.
- BARST, R. J. et al. Updated Evidence-Based Treatment Algorithm in Pulmonary Arterial Hypertension **Journal of the American College of Cardiology** NIH Public Access, , 30 jun. 2009.
- BEHONICK, G. S. et al. Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes). **Journal of applied toxicology** , 2001.
- BELLO-KLEIN, A. et al. Role of Redox Homeostasis and Inflammation in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 11, p. 1340–1351, 17 abr. 2018.
- BOGAARD, H. J. et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. **Chest**, v. 135, n. 3, p. 794–804, mar. 2009.
- BORCHI, E. et al. Enhanced ROS production by NADPH oxidase is correlated to changes in antioxidant enzyme activity in human heart failure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1802, n. 3, p. 331–338, mar. 2010.
- BOURGEOIS, A. et al. Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 1 nov. 2018.
- BOWERS, R. et al. Oxidative Stress in Severe Pulmonary Hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 6, p. 764–769, 15 mar. 2004.
- BRISTOW, M. R. et al. β 1- and β 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: Coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective β 1-receptor down-regulation in heart failure. **Circulation Research**, v. 59, n. 3, p. 297–309, 1986.
- BROWN, K. A. et al. Menopause is a determinant of breast aromatase expression and its associations with BMI, inflammation, and systemic markers. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 102, n. 5, p. 1692–1701, 1 maio 2017.
- BROWN, L. M. et al. Delay in recognition of pulmonary arterial hypertension: Factors identified from the REVEAL registry. **Chest**, v. 140, n. 1, p. 19–26, 1 jul. 2011.
- BRUCE, E. et al. Selective activation of angiotensin AT2 receptors attenuates progression of pulmonary hypertension and inhibits cardiopulmonary fibrosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 9, p. 2219–2231, 5 jan. 2015.
- BUDHIRAJA, R.; TUDER, R. M.; HASSOUN, P. M. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension **Circulation**, 20 jan. 2004.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1 jan. 1978.
- CAI, C. et al. Formononetin attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via inhibiting pulmonary vascular remodeling in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 6, p. 4984–4992, 2019.
- CAMPIAN, M. E. et al. Early inflammatory response during the development of right ventricular heart failure in a rat model. **European Journal of Heart Failure**, v. 12, n. 7, p. 653–658, jul. 2010.
- CASLIN, A. W. et al. The histopathology of 36 cases of plexogenic pulmonary arteriopathy. **Histopathology**, v. 16, n. 1, p. 9–19, 1 jan. 1990.
- CEBULA, M.; SCHMIDT, E. E.; ARNÉR, E. S. J. TrxR1 as a potent regulator of the Nrf2-Keap1 response system **Antioxidants and Redox Signaling**, 1 out. 2015.
- CHANG, H. et al. Magnolol ameliorates pneumonectomy and monocrotaline-induced pulmonary arterial

hypertension in rats through inhibition of angiotensin II and endothelin-1 expression. **Phytomedicine**, v. 51, p. 205–213, 1 dez. 2018.

CHEN, B. et al. Thioredoxin-1 mediates hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 305, n. 5, 1 set. 2013.

CHEN, J. et al. Thioredoxin-interacting protein stimulates its own expression via a positive feedback loop. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 5, p. 674–680, 2014.

CHESTER, A. H.; YACOUB, M. H. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. **Global Cardiology Science and Practice**, v. 2014, n. 2, p. 29, jun. 2014.

CHRISTMAN, B. W. et al. An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 2, p. 70–75, 9 jul. 1992.

CHRISTOU, H. et al. Improved pulmonary vascular reactivity and decreased hypertrophic remodeling during nonhypercapnic acidosis in experimental pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 9, 1 maio 2012.

CHUNG, J. W. et al. Vitamin D3 upregulated protein 1 (VDUP1) is a regulator for redox signaling and stress-mediated diseases **Journal of Dermatology** J Dermatol, , out. 2006.

CIANFROCCA, R. et al. β -arrestin-1 mediates the endothelin-1-induced activation of Akt and integrin-linked kinase. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, n. 8, p. 796–801, ago. 2010.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis **Free Radical Biology and Medicine**, 15 mar. 2010.

COGHLAN, J. G. et al. Targeting the Prostacyclin Pathway with Selexipag in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension Receiving Double Combination Therapy: Insights from the Randomized Controlled GRIPHON Study. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, v. 18, n. 1, p. 37–47, 1 fev. 2018.

COHN, J. N.; FERRARI, R.; SHARPE, N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 569–582, 1 mar. 2000.

COLOMBO, R. et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 91, n. 1, p. 38–44, jan. 2013.

CONDON, D. F. et al. The 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension: what's old is new **F1000Research**, 19 jun. 2019.

CONG, N. et al. Activation of ETA Receptor by Endothelin-1 Induces Hepatocellular Carcinoma Cell Migration and Invasion via ERK1/2 and AKT Signaling Pathways. **Journal of Membrane Biology**, v. 249, n. 1–2, p. 119–128, 1 abr. 2016.

CORREIA-PINTO, J. et al. Time course and mechanisms of left ventricular systolic and diastolic dysfunction in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Basic Research in Cardiology**, v. 104, n. 5, p. 535–545, 2009.

COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling **Biochemical Journal**, 2010.

D'ALONZO, G. E. et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. **Annals of internal medicine**, v. 115, n. 5, p. 343–9, 1 set. 1991.

DA SILVA GONÇALVES BÓIS, D. et al. Contribution of impaired parasympathetic activity to right ventricular dysfunction and pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 137, n. 9, p. 910–924, 2018.

DAICHO, T. et al. Possible Involvement of Mitochondrial Energy-Producing Ability in the Development of Right Ventricular Failure in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. **Journal of**

Pharmacological Sciences J Pharmacol Sci, v. 111, p. 1, 2009.

DAVIE, N. et al. ETA and ETB receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 3, p. 398–405, 1 fev. 2002.

DE LIMA-SEOLIN, B. G. et al. Bucindolol attenuates the vascular remodeling of pulmonary arteries by modulating the expression of the endothelin-1 A receptor in rats with pulmonary arterial hypertension. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, p. 704–714, 1 mar. 2018.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological reviews**, 1970.

DIAS, C. A.; CAU, S. B. D. A.; TANUS-SANTOS, J. E. Papel do óxido nítrico na regulação da circulação pulmonar: Implicações fisiológicas, fisiopatológicas e terapêuticas **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, jun. 2008.

DOS SANTOS LACERDA, D. et al. Pterostilbene reduces oxidative stress, prevents hypertrophy and preserves systolic function of right ventricle in cor pulmonale model. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 19, p. 3302–3314, 2017.

DOS SANTOS, M. R. G. DE A. et al. Use of methylene blue in the reversal of vasoplegia refractory to the use of catecholamines after aortobifemoral bypass. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 9, n. 1, p. 74–77, 2010.

DUMAS DE LA ROQUE, E.; SAVINEAU, J. P.; BONNET, S. Dehydroepiandrosterone: A new treatment for vascular remodeling diseases including pulmonary arterial hypertension **Pharmacology and Therapeutics**, 2010.

DUMITRASCU, R. et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. **BMC pulmonary medicine**, v. 8, p. 25, 2008.

ELAHI, M. M.; KONG, Y. X.; MATATA, B. M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, nov. 2009.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1 maio 1959.

FARAHMAND, F.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 260, n. 1–2, p. 21–9, maio 2004.

FIRTH, A. L.; MANDEL, J.; YUAN, J. X. Idiopathic pulmonary arterial hypertension. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 3, n. 5–6, p. 268–273, maio 2010.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. [12] Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114–120, 1 jan. 1984.

FODERARO, A.; VENTETUOLO, C. E. Pulmonary Arterial Hypertension and the Sex Hormone Paradox **Current Hypertension Reports**, 1 nov. 2016.

FORFIA, P. R. et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 174, n. 9, p. 1034–1041, 1 nov. 2006.

FRID, M. G. et al. Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. **Circulation Research**, v. 81, n. 6, p. 940–952, 1997.

FUJI, S. et al. Association between endothelial function and micro-vascular remodeling measured by synchrotron radiation pulmonary micro-angiography in pulmonary arterial hypertension. **General Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 64, n. 10, p. 597–603, 1 out. 2016.

FULLERTON, D. A.; HAHN, A. R.; MCINTYRE, R. C. Mechanistic imbalance of pulmonary vasomotor control in progressive lung injury. **Surgery**, v. 119, n. 1, p. 98–103, 1 jan. 1996.

FULTON, D. J. R. et al. Reactive oxygen and nitrogen species in the development of pulmonary hypertension

Antioxidants, 1 set. 2017.

GALIÈ, N. et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, 1 out. 2015.

GALIÉ, N.; MANES, A.; BRANZI, A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension **Cardiovascular Research**, 1 fev. 2004.

GALOUGAHI, K. K. et al. Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 2, 2014.

GAN, C. T. J. et al. Noninvasively assessed pulmonary artery stiffness predicts mortality in pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 132, n. 6, p. 1906–1912, 2007.

GHOFRANI, H. A. et al. Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 4, p. 330–340, 2013.

GIAID, A. et al. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 24, p. 1732–1739, 17 jun. 1993.

GIAID, A.; SALEH, D. Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 4, p. 214–221, 27 jul. 1995.

GIORDANO, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 500–508, 1 mar. 2005.

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 4, p. L363–L369, 15 fev. 2012.

GONZALEZ, E. A. et al. Cathepsin B inhibition attenuates cardiovascular pathology in mucopolysaccharidosis I mice. **Life Sciences**, v. 196, p. 102–109, 1 mar. 2018.

GORDAN, R.; GWATHMEY, J. K.; XIE, L.-H. Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 4, p. 204, 2015.

GOW, A. J. et al. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, ago. 2004.

GREYSON, C. R. The Right Ventricle and Pulmonary Circulation: Basic Concepts. **Revista Española de Cardiología (English Edition)**, v. 63, n. 1, p. 81–95, 1 jan. 2010.

GROSS, S. S. Nitric Oxide Synthases and Their Cofactors. In: **Nitric Oxide and the Kidney**. [s.l.] Springer US, 1997. p. 52–65.

GUIGNABERT, C. et al. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: Lessons from cancer **European Respiratory Review**, 1 dez. 2013.

HADDAD, F. et al. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: Pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure **Circulation**, 1 abr. 2008.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life **Plant Physiology**, jun. 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HALPERN, S. D.; TAICHMAN, D. B. Misclassification of pulmonary hypertension due to reliance on pulmonary capillary wedge pressure rather than left ventricular end-diastolic pressure. **Chest**, v. 136, n. 1, p. 37–43, 1 jul. 2009.

HAMILTON, S. J.; WATTS, G. F. Endothelial dysfunction in diabetes: Pathogenesis, significance, and treatment **Review of Diabetic Studies**, 2013.

- HAN, J.-C. et al. Left-Ventricular Energetics in Pulmonary Arterial Hypertension-Induced Right-Ventricular Hypertrophic Failure. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JAN, p. 1115, 9 jan. 2018.
- HANDOKO, M. L. et al. Perspectives on novel therapeutic strategies for right heart failure in pulmonary arterial hypertension: Lessons from the left heart **European Respiratory Review**, 1 mar. 2010.
- HANSEN, T. et al. Oxidative and nitrosative signalling in pulmonary arterial hypertension — Implications for development of novel therapies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 165, p. 50–62, 1 set. 2016.
- HARDZIYENKA, M. et al. Electrophysiologic remodeling of the left ventricle in pressure overload-induced right ventricular failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 24, p. 2193–2202, 12 jun. 2012.
- HASSOUN, P. M. et al. Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling **Journal of the American College of Cardiology** J Am Coll Cardiol, , 30 jun. 2009.
- HESSEL, M. H. M. et al. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 5, p. H2424–H2430, nov. 2006.
- HILL, N. S.; GILLESPIE, M. N.; MCMURTRY, I. F. Fifty Years of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension: What Has It Meant to the Field? **Chest**, 1 dez. 2017.
- HIRSCH, A. M. et al. Unilateral pulmonary artery thrombotic occlusion: Is distal arteriopathy a consequence? **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 154, n. 2, p. 491–496, 1996.
- HOEPER, M. M. et al. Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: Results from the COMPERA registry. **International Journal of Cardiology**, v. 168, n. 2, p. 871–880, 30 set. 2013.
- HOEPER, M. M. et al. A global view of pulmonary hypertension **The Lancet Respiratory Medicine** Lancet Publishing Group, , 1 abr. 2016.
- HOEPER, M. M. et al. Mortality in pulmonary arterial hypertension: prediction by the 2015 European pulmonary hypertension guidelines risk stratification model. **The European respiratory journal**, v. 50, n. 2, p. 1700740, 1 ago. 2017.
- HOLMGREN, A. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems, **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. 1989.
- HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 252, n. C, p. 199–208, 1 jan. 1995.
- HORINOUCI, T. et al. Endothelin receptor signaling: New insight into its regulatory mechanisms **Journal of Pharmacological Sciences** Elsevier, , 1 jan. 2013.
- HSU, W. L. et al. Baicalein Ameliorates Pulmonary Arterial Hypertension Caused by Monocrotaline through Downregulation of ET-1 and ETAR in Pneumectomized Rats. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 46, n. 4, p. 769–783, 2018.
- HU, M. L. et al. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 121, n. 2, p. 257–262, 1993.
- HUMBERT, M. et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, n. 5, p. 1628–1631, 20 maio 1995.
- HUMBERT, M. et al. Pulmonary arterial hypertension in France: Results from a national registry. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 173, n. 9, p. 1023–1030, 1 maio 2006.
- HUMBERT, M. et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. **The European respiratory journal**, v. 53, n. 1, 1 jan. 2019.

- HUMBERT, M.; SITBON, O.; SIMONNEAU, G. Treatment of pulmonary arterial hypertension **New England Journal of Medicine**, 30 set. 2004.
- HUXTABLE, R. J. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids **Pharmacology and Therapeutics**, 1990.
- HUYNH, N. N.; CHIN-DUSTING, J. AMINO ACIDS, ARGINASE AND NITRIC OXIDE IN VASCULAR HEALTH. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 1–2, p. 1–8, 1 jan. 2006.
- IGNARRO, L. J. Wei Lun Visiting Professorial Lecture: Nitric Oxide in the Regulation of Vascular Function: An Historical Overview. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 17, n. 4, p. 301–306, 12 jul. 2010.
- IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev. bras. hipertens**, p. 55–62, 2001.
- ISHIKAWA, S. et al. Biventricular down-regulation of beta-adrenergic receptors in right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline. **Japanese circulation journal**, v. 55, n. 11, p. 1077–85, nov. 1991.
- JACOBS, W. et al. The Right Ventricle Explains Sex Differences in Survival in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. **Chest**, v. 145, n. 6, p. 1230–1236, 2014.
- JARDIN, F. et al. Quantitative two-dimensional echocardiography in massive pulmonary embolism: Emphasis on ventricular interdependence and leftward septal displacement. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 10, n. 6, p. 1201–1206, 1987.
- JING, Z. C. et al. Registry and survival study in Chinese patients with idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 132, n. 2, p. 373–379, 2007.
- JING, Z. C. et al. Vardenafil in pulmonary arterial hypertension: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, n. 12, p. 1723–1729, 15 jun. 2011.
- JONES, J. E. et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 1 52-1, 2002.
- JONES, R. Ultrastructural analysis of contractile cell development in lung microvessels in hyperoxic pulmonary hypertension: Fibroblasts and intermediate cells selectively reorganize nonmuscular segments. **American Journal of Pathology**, v. 141, n. 6, p. 1491–1505, 1992.
- JUNN, E. et al. Vitamin D 3 Up-Regulated Protein 1 Mediates Oxidative Stress Via Suppressing the Thioredoxin Function . **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6287–6295, 15 jun. 2000.
- KAKOUIROS, N. et al. Tissue Doppler Imaging of the Tricuspid Annulus and Myocardial Performance Index in the Evaluation of Right Ventricular Involvement in the Acute and Late Phase of a First Inferior Myocardial Infarction. **Echocardiography**, v. 28, n. 3, p. 311–319, 1 mar. 2011.
- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms **Redox Biology**, 1 jan. 2013.
- KAMEJI, R.; OTSUKA, H.; HAYASHI, Y. Increase of collagen synthesis in pulmonary arteries of monocrotaline-treated rats. **Experientia**, v. 36, n. 4, p. 441–442, abr. 1980.
- KAMEZAKI, F. et al. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 177, n. 2, p. 219–226, 15 jan. 2008.
- KARAVOLIAS, G. K. et al. Short and long term anti-inflammatory effects of bosentan therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: Relation to clinical and hemodynamic responses. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 14, n. 12, p. 1283–1289, dez. 2010.
- KATUSIC, Z. S.; D'USCIO, L. V.; NATH, K. A. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects **Trends in Pharmacological Sciences**, jan. 2009.

- KHAPER, N. et al. Targeting the Vicious Inflammation–Oxidative Stress Cycle for the Management of Heart Failure. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 7, p. 1033–1049, 19 out. 2010.
- KLIMA, U.; GUERRERO, J. L.; VLAHAKES, G. J. Contribution of the interventricular septum to maximal right ventricular function. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 14, n. 3, p. 250–255, 1 set. 1998.
- KLINGBERG, F.; HINZ, B.; WHITE, E. S. The myofibroblast matrix: Implications for tissue repair and fibrosis **Journal of Pathology**, jan. 2013.
- KLINGER, J. Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 3, p. 269, nov. 2009.
- KONSTAM, M. A. et al. Evaluation and Management of Right-Sided Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association **Circulation**, 15 maio 2018.
- KOSKENVUO, J. W. et al. A comparison of echocardiography to invasive measurement in the evaluation of pulmonary arterial hypertension in a rat model. **International Journal of Cardiovascular Imaging**, v. 26, n. 5, p. 509–518, jun. 2010.
- KOVACS, G. et al. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: A systematic review **European Respiratory Journal**, out. 2009.
- KUC, R. E. et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension. **Life sciences**, v. 118, n. 2, p. 391–396, 24 nov. 2014.
- LACERDA, D. et al. Stilbenoid pterostilbene complexed with cyclodextrin preserves left ventricular function after myocardial infarction in rats: possible involvement of thiol proteins and modulation of phosphorylated GSK-3 β . **Free Radical Research**, v. 52, n. 9, 2018.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LAHM, T. et al. Exogenous estrogen rapidly attenuates pulmonary artery vasoreactivity and acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Shock**, v. 30, n. 6, p. 660–667, 1 dez. 2008.
- LAHM, T.; KAWUT, S. M. Inhibiting oestrogen signalling in pulmonary arterial hypertension: Sex, drugs and research **European Respiratory Journal**, 1 ago. 2017.
- LAHM, T.; TUDER, R. M.; PETRACHE, I. Progress in solving the sex hormone paradox in pulmonary hypertension **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, 1 jul. 2014.
- LAI, Y. C. et al. Pulmonary arterial hypertension: The clinical syndrome. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 115–130, 20 jun. 2014.
- LALICH, J. J.; MERKOW, L. Pulmonary arteritis produced in rat by feeding *Crotalaria spectabilis*. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 10, p. 744–750, 1 jul. 1961.
- LAN, N. et al. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. **Diseases**, v. 6, n. 2, p. 38, 16 maio 2018.
- LANDINO, L. M. et al. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 26, p. 15069–15074, 24 dez. 1996.
- LANDSBERG, J. W.; YUAN, J. X. J. Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation **News in Physiological Sciences**, 1 abr. 2004.
- LAPA, M. S. et al. Características clínicas dos pacientes com hipertensão pulmonar em dois centros de referência em São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 3, p. 139–143, jun. 2006.
- LAU, E. M. T. et al. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 10, p. 603–614, 8 out. 2017.

- LAUNAY, J. M. et al. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. **Nature Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1129–1135, 16 set. 2002.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1 mar. 1992.
- LEE, S.; KIM, S. M.; LEE, R. T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: From molecular mechanisms to functional significance **Antioxidants and Redox Signaling**, 1 abr. 2013.
- LEICHSENDRING-SILVA, F. et al. Association of the time course of pulmonary arterial hypertension with changes in oxidative stress in the left ventricle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 38, n. 12, p. 804–810, 1 dez. 2011.
- LEINWEBER, K.; SEYFARTH, T.; BRODDE, O.-E. Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake 1) in right ventricles of monocrotaline-treated rats **British Journal of Pharmacology**. 2000.
- LI, C. Y. et al. The effects and mechanism of ginsenoside Rg1 on myocardial remodeling in an animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **European Journal of Medical Research**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 5 jun. 2013.
- LI, J. C. et al. Expression of PDGF- β receptor in broilers with pulmonary hypertension induced by cold temperature and its association with pulmonary vascular remodeling. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 1, p. 116–121, 1 fev. 2010.
- LIAO, J. K. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 2, p. 540–541, 1 fev. 2013.
- LILLIE, R. D. (RALPH D.); FULLMER, H. M. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. [s.l.] McGraw-Hill, 1976.
- LIMA-SEOLIN, B. G. DE et al. Bucindolol improves right ventricle function in rats with pulmonary arterial hypertension through the reversal of autonomic imbalance. **European Journal of Pharmacology**, v. 798, p. 57–65, 5 mar. 2017.
- LING, Y. et al. The role of endothelin-1 and the endothelin B receptor in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome in the rat. **Hepatology**, v. 39, n. 6, p. 1593–1602, jun. 2004.
- LING, Y. et al. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: Results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 8, p. 790–796, 15 out. 2012.
- LIU, J. et al. IL-33 Initiates Vascular Remodelling in Hypoxic Pulmonary Hypertension by up-Regulating HIF-1 α and VEGF Expression in Vascular Endothelial Cells. **EBioMedicine**, v. 33, p. 196–210, 1 jul. 2018.
- LOURENÇO, A. P. et al. Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 4, p. H1587–H1594, out. 2006.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.
- LUDKE, A. R. L. et al. Modulation of Monocrotaline-Induced Cor Pulmonale by Grape Juice. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 89–95, 1 jan. 2010.
- LUO, H. R. et al. Akt as a mediator of cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11712–11717, 30 set. 2003.
- LUSCHER, T. F.; BARTON, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. **Circulation**, v. 102, n. 19 SUPPL., p. 2434–2440, 7 nov. 2000.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification **Chemico-**

Biological Interactions, 5 dez. 2014.

LYMPEROPOULOS, A.; RENGO, G.; KOCH, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: Pathophysiology and therapy. **Circulation Research**, v. 113, n. 6, p. 739–753, 2013.

MA, X. et al. Rapamycin reduced pulmonary vascular remodelling by inhibiting cell proliferation via Akt/mTOR signalling pathway down-regulation in the carotid artery-jugular vein shunt pulmonary hypertension rat model. **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, v. 25, n. 2, p. 206–211, 1 ago. 2017.

MAARMAN, G. et al. Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 3, p. 343–353, 1 out. 2015.

MAHMOOD, D. F. D. et al. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease **Antioxidants and Redox Signaling**, 10 out. 2013.

MAIR, K. M. et al. Pulmonary arterial hypertension: Basis of sex differences in incidence and treatment response **British Journal of Pharmacology**, fev. 2014.

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

MAM, V. et al. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 455–562, fev. 2010.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARUYAMA, J. et al. Continuous low-dose NO inhalation does not prevent monocrotaline- induced pulmonary hypertension in rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 272, n. 1 41-1, 1997.

MASON, N. A. et al. High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. **Journal of Pathology**, v. 185, n. 3, p. 313–318, jul. 1998.

MASRI, F. A. et al. Deficiency of lung antioxidants in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Clinical and Translational Science**, v. 1, n. 2, p. 99–106, 2008.

MATA-GREENWOOD, E. et al. Expression of VEGF and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 1 29-1, 1 jul. 2003.

MATORI, H. et al. Genistein, a soy phytoestrogen, reverses severe pulmonary hypertension and prevents right heart failure in rats. **Hypertension**, v. 60, n. 2, p. 425–430, ago. 2012.

MATSUMOTO, H. et al. Abundance of endothelin-3 in rat intestine, pituitary gland and brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 164, n. 1, p. 74–80, 16 out. 1989.

MCGOON, M. D. et al. Pulmonary arterial hypertension: Epidemiology and registries. **Journal of the American College of Cardiology**, 24 dez. 2013.

MCLAUGHLIN, V. V. et al. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association Developed in Collaboration With the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association **Journal of the American College of Cardiology**, 28 abr. 2009.

MEYRICK, B.; REID, L. Ultrastructural features of the distended pulmonary arteries of the normal rat. **The Anatomical Record**, v. 193, n. 1, p. 71–97, 1 jan. 1979.

MIHARA, K. et al. Investigation of safety and efficacy of the new more thermostable formulation of Flolan

(epoprostenol) in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension (PAH)-An open-label, single-arm study. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2018.

MIKHAEI, M. et al. Oxidative stress and its implications in the right ventricular remodeling secondary to pulmonary hypertension **Frontiers in Physiology**Frontiers Media S.A., , 1 set. 2019.

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

MONCADA, S.; ERUSALIMSKY, J. D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 1 mar. 2002.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology **British Journal of Pharmacology**Br J Pharmacol, jan. 2006. MORRELL, N. W. et al. Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. 2009.

MOSELE, F. et al. Effects of purple grape juice in the redox-sensitive modulation of right ventricular remodeling in a pulmonary arterial hypertension model. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 60, n. 1, p. 15–22, jul. 2012.

NAEIJE, R.; DEWACHTER, L. Animal models of pulmonary arterial hypertension. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 24, n. 4, p. 481–496, 1 abr. 2007.

NISHIYAMA, A. et al. Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. **IUBMB Life**, 2001.

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

NOZAWA, E. et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 5, p. 687–695, maio 2006.

NOZIK-GRAYCK, E. et al. Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 3, p. L422, set. 2008.

OKUMURA, K. et al. Carvedilol improves biventricular fibrosis and function in experimental pulmonary hypertension. **Journal of Molecular Medicine**, v. 93, n. 6, p. 663–674, 16 jun. 2015.

OLSCHEWSKI, H. Inhaled iloprost for the treatment of pulmonary hypertension. **European Respiratory Review**, v. 18, n. 111, p. 29–34, 1 mar. 2009.

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

PALACE, V. P. et al. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction. **Circulation**, v. 99, n. 1, p. 121–6, 1999.

PALL, M. L. Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO- cycle. **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 4, p. 821–825, 2007.

PARIKH, V.; BHARDWAJ, A.; NAIR, A. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension **Journal of Thoracic Disease**, 2019.

PARIKH, R. V. et al. Endothelin-1 predicts hemodynamically assessed pulmonary arterial hypertension in HIV infection. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 11 jan. 2016.

PATEL, J. K.; RAO, Y.; STRACHAN, P. Impact of Pulmonary Capillary Wedge Pressure on Long-Term Mortality in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Treated With Parenteral Trepostinil. **Heart Lung and Circulation**, v. 27, n. 2, p. 183–189, 1 fev. 2018.

- PERON, A. P. O. N. et al. A função mecânica do miocárdio remanescente a um infarto do miocárdio é normal durante o período de cicatrização, embora exista insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 86, n. 2, p. 105–112, fev. 2006.
- PERROS, F. et al. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 3, p. 462–468, 1 mar. 2007.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological Methods**, v. 38, n. 1–2, p. 161–170, 13 nov. 1980.
- PINSKY, M. R. The right ventricle: Interaction with the pulmonary circulation **Critical Care**, 10 set. 2016.
- POIANI, George J. et al. Collagen and elastin metabolism in hypertensive pulmonary arteries of rats. **Circulation research**, v. 66, n. 4, p. 968–978, 1990.
- PORTNOY, S. G.; RUDSKI, L. G. Echocardiographic Evaluation of the Right Ventricle: a 2014 Perspective **Current Cardiology Reports**, 1 abr. 2015.
- POWERS, S. K.; LENNON, S. L. **Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle**. Proceedings of the Nutrition Society. **Anais...CAB International**, 1999Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10817171/>>. Acesso em: 29 set. 2020
- PRICE, L. C. et al. Inflammation in pulmonary arterial hypertension **Chest**, 2012.
- PRINS, K. W.; THENAPPAN, T. World Health Organization Group I Pulmonary Hypertension: Epidemiology and Pathophysiology **Cardiology Clinics**W.B. Saunders, , 1 ago. 2016.
- PULIDO, T. et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 809–818, 2013.
- RABINOVITCH, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension **Journal of Clinical Investigation**, 3 dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23202738/>>. Acesso em: 2 out. 2020
- RAFIKOV, R. et al. Role of gender in regulation of redox homeostasis in pulmonary arterial hypertension **Antioxidants**, 1 maio 2019.
- RAFIKOVA, O. et al. Bosentan inhibits oxidative and nitrosative stress and rescues occlusive pulmonaryhypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 56, p. 28–43, mar. 2013.
- RAVI, Y. et al. Dysregulation of PTEN in Cardiopulmonary Vascular Remodeling Induced by Pulmonary Hypertension. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 2, p. 363–372, 2013.
- REDDY, S.; BERNSTEIN, D. Molecular Mechanisms of Right Ventricular Failure. **Circulation**, v. 132, n. 18, p. 1734–1742, 3 nov. 2015.
- REINDEL, J. F. et al. Development of morphologic, hemodynamic, and biochemical changes in lungs of rats given monocrotaline pyrrole. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 106, n. 2, p. 179–200, 1 nov. 1990.
- REIS, G. S. et al. Oxidative-stress biomarkers in patients with pulmonary hypertension. **Pulm Circ**, v. 3, n. 4, p. 856–861, 2013.
- RICH, S. et al. Long-term effects of epoprostenol on the pulmonary vasculature in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 138, n. 5, p. 1234–1239, 1 nov. 2010.
- RICH, S.; BRUNDAGE, B. H. High-dose calcium channel-blocking therapy for primary pulmonary hypertension: evidence for long-term reduction in pulmonary arterial pressure and regression of right ventricular hypertrophy. **Circulation**, v. 76, n. 1, p. 135–141, jul. 1987.
- RUDSKI, L. G. et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography.

Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography, v. 23, n. 7, p. 685–713; quiz 786–8, 1 jul. 2010.

RUSIECKI, J. et al. Sex and menopause differences in response to tadalafil: 6-Minute walk distance and time to clinical worsening. **Pulmonary Circulation**, v. 5, n. 4, p. 701–706, 15 out. 2015.

RYAN, J. J. et al. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. **The Canadian journal of cardiology**, v. 31, n. 4, p. 391–406, abr. 2015.

RYAN, J. J.; ARCHER, S. L. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: Disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 176–188, 20 jun. 2014.

SAHAY, S. Evaluation and classification of pulmonary arterial hypertension **Journal of Thoracic Disease**, 2019.

SAKAO, S.; TATSUMI, K. Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: Multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities **International Journal of Cardiology**, 17 fev. 2011.

SANZ, J. et al. Anatomy, Function, and Dysfunction of the Right Ventricle: JACC State-of-the-Art Review **Journal of the American College of Cardiology**, 2 abr. 2019.

SAVAI, R. et al. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, n. 9, p. 897–908, 1 nov. 2012.

SCHENA, M. et al. Echo-Doppler evaluation of left ventricular impairment in chronic cor pulmonale. **Chest**, v. 109, n. 6, p. 1446–1451, 1 jun. 1996.

SCHENK, H. et al. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 5, p. 1672–1676, 1 mar. 1994.

SCHENKEL, P. C. et al. Time course of hydrogen peroxide-thioredoxin balance and its influence on the intracellular signalling in myocardial infarction. **Experimental Physiology**, v. 97, n. 6, p. 741–749, 2012.

SCHERMULY, R. T. et al. Mechanisms of disease: Pulmonary arterial hypertension **Nature Reviews Cardiology**, ago. 2011.

SCHOENTAL, R.; HEAD, M. A. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. **British Journal of Cancer**, v. 9, n. 1, p. 229–237, 1955.

SEYFARTH, T. et al. The cardiac β -adrenoceptor-G-protein(s)-adenylyl cyclase system in monocrotaline-treated rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, n. 12, p. 2315–2326, 1 dez. 2000.

SHAH, M.; PATEL, K.; SEHGAL, P. B. Monocrotaline pyrrole-induced endothelial cell megalocytosis involves a Golgi blockade mechanism. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, p. 850–862, 2005.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 24 abr. 2012.

SHENOY, V. et al. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 8, p. 1065–1072, 15 out. 2010.

SHI, R. et al. Baicalein attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition. **Life Sciences**, v. 207, p. 442–450, 15 ago. 2018.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3 SUPPL. 3, 30 set. 1991.

SILVA, A. F. et al. Anti-remodeling effects of xanthohumol-fortified beer in pulmonary arterial hypertension

mediated by ERK and AKT inhibition. **Nutrients**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2019.

SILVIO GUTKIND, J. Cell growth control by G protein-coupled receptors: From signal transduction to signal integration **Oncogene**, 17 set. 1998.

SIMONNEAU, G. et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. **The European respiratory journal**, v. 53, n. 1, 1 jan. 2019.

SIQUEIRA, R. et al. Effects of ovariectomy on antioxidant defence systems in the right ventricle of female rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 96, n. 3, p. 295–303, 2018.

SISNIEGA, C.; ZAYAS, N.; PULIDO, T. Advances in medical therapy for pulmonary arterial hypertension. **Current Opinion in Cardiology**, v. 34, n. 1, p. 98–103, 1 jan. 2019.

SITBON, O. et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 111, n. 23, p. 3105–3111, 14 jun. 2005.

SMITH, L. W.; CULVENOR, C. C. J. Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 2, p. 129–152, 1981.

SOMANI, A. et al. Blood outgrowth endothelial cells overexpressing eNOS mitigate pulmonary hypertension in rats: a unique carrier cell enabling autologous cell-based gene therapy. **Translational Research**, v. 210, p. 1–7, 1 ago. 2019.

SOON, E. et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 122, n. 9, p. 920–927, 31 ago. 2010.

SOUZA-RABBO, M. P. et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 8, p. 944–948, ago. 2008.

STEFANON, I. et al. Left and right ventricle late remodeling following myocardial infarction in rats. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e64986, 2013.

STEFFEN, B. T.; LEES, S. J.; BOOTH, F. W. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 6, p. 1950–1958, dez. 2008.

STEWART, D. J. et al. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: Marker or mediator of disease? **Annals of Internal Medicine**, v. 114, n. 6, p. 464–469, 15 mar. 1991.

STRANGE, G. et al. Survival of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients in the Modern Era in Australia and New Zealand. **Heart, Lung and Circulation**, v. 27, n. 11, p. 1368–1375, 1 nov. 2018.

SUN, W.; CHAN, S. Y. Pulmonary Arterial Stiffness: An Early and Pervasive Driver of Pulmonary Arterial Hypertension. **Frontiers in Medicine**, v. 5, 18 jul. 2018.

SWETZ, K. M. et al. Symptom burden, quality of life, and attitudes toward palliative care in patients with pulmonary arterial hypertension: Results from a cross-sectional patient survey. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 31, n. 10, p. 1102–1108, out. 2012.

SZTUKA, K.; JASIŃSKA-STROSCHEIN, M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. **Pharmacological Research**, v. 125, p. 201–214, 1 nov. 2017.

TABIMA, D. M.; FRIZZELL, S.; GLADWIN, M. T. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension **Free Radical Biology and Medicine**, 1 maio 2012.

TAKAHASHI, T. et al. Semotiadil improves survival of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension: Comparison with diltiazem. **European Journal of Pharmacology**, v. 295, n. 2–3, p. 229–234, 11 jan. 1996.

- TAVARES, A. M. V. et al. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. **Life Sciences**, v. 87, n. 23–26, p. 699–706, 18 dez. 2010.
- THAYER, J. F.; HANSEN, A. L.; JOHNSEN, B. H. The Non-invasive Assessment of Autonomic Influences on the Heart Using Impedance Cardiography and Heart Rate Variability. In: **Handbook of Behavioral Medicine**. [s.l.] Springer New York, 2010. p. 723–740.
- THENAPPAN, T. et al. Survival in pulmonary arterial hypertension: A reappraisal of the NIH risk stratification equation. **European Respiratory Journal**, v. 35, n. 5, p. 1079–1087, 1 maio 2010.
- THENAPPAN, T.; RYAN, J. J.; ARCHER, S. L. Evolving epidemiology of pulmonary arterial hypertension **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 15 out. 2012.
- THIWANKA WIJERATNE, D. et al. Increasing Incidence and Prevalence of World Health Organization Groups 1 to 4 Pulmonary Hypertension: A Population-Based Cohort Study in Ontario, Canada. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2018.
- TODOROVICH-HUNTER, L. et al. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. **American Review of Respiratory Disease**, v. 146, n. 1, p. 213–223, 17 dez. 1992.
- TONELLI, A. R. et al. Causes and circumstances of death in pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 188, n. 3, p. 365–369, 1 ago. 2013.
- TOZZI, C. A. et al. **Mast cell colla Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** [s.l: s.n.].
- TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, p. 2181–2190, 2011.
- TUDER, R. M. et al. Pathology of Pulmonary Hypertension **Clinics in Chest Medicine**, mar. 2007.
- TÜRCK, P. et al. Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension. **Nutrition**, v. 70, p. 110579, 1 fev. 2020.
- UEDA, S. et al. Redox control of cell death. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 4, n. 3, p. 405–414, 2002.
- UMAR, S. et al. Intralipid prevents and rescues fatal pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure in rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 58, n. 3, p. 512–8, 1 set. 2011.
- URBONIENE, D. et al. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 299, n. 3, p. L401–L412, set. 2010.
- VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension **Canadian Journal of Cardiology**, 1 abr. 2015.
- VAILLANCOURT, M. et al. Autonomic nervous system involvement in pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, p. 201, 4 dez. 2017.
- VALDEZ, L. B.; ZAORNYJ, T.; BOVERIS, A. Functional Activity of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2005. v. 396p. 444–455.
- VAN DE VEERDONK, M. C. et al. Progressive right ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to therapy. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 24, p. 2511–2519, 6 dez. 2011.
- VAN GUILDER, G. P. et al. A. DeSouza Reduced by Regular Aerobic Exercise Endothelin-1 Vasoconstrictor Tone Increases With Age in Healthy Men But Can Be. 2007.
- VARSHNEY, R. et al. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension involves downregulation of antiaging protein klotho and eNOS activity. **Hypertension**, v. 68, n. 5, p. 1255–1263, 1 nov. 2016.
- VELEZ-ROA, S. et al. Increased Sympathetic Nerve Activity in Pulmonary Artery Hypertension. **Circulation**,

v. 110, n. 10, p. 1308–1312, 7 set. 2004.

VIZZA, C. D. et al. Relationship between baseline ET-1 plasma levels and outcome in patients with idiopathic pulmonary hypertension treated with bosentan. **International Journal of Cardiology**, v. 167, n. 1, p. 220–224, 15 jul. 2013.

VOELKEL, N. F. et al. Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 11, n. 6, p. 664–675, 20 dez. 1994.

VONK-NOORDEGRAAF, A. et al. Right Heart Adaptation to Pulmonary Arterial Hypertension: Physiology and Pathobiology. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25, p. D22–D33, 24 dez. 2013.

VONK NOORDEGRAAF, A.; GALIÈ, N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension **European Respiratory Review**, 1 dez. 2011.

WAKASUGI, H. et al. Epstein-Barr virus-containing B-cell line produces an interleukin 1 that it uses as a growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 3, p. 804–808, 1987.

WANG, H. M. et al. Fluoxetine inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling involved in inhibition of RhoA-Rho kinase and Akt signalling pathways in rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 90, n. 11, p. 1506–1515, nov. 2012.

WANG, J. et al. Carotid baroreceptor stimulation improves cardiac performance and reverses ventricular remodelling in canines with pacing-induced heart failure. **Life Sciences**, v. 222, p. 13–21, 1 abr. 2019a.

WANG, X.; SHULTS, N. V.; SUZUKI, Y. J. Oxidative pro-ling of the failing right heart in rats with pulmonary hypertension. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 1 maio 2017.

WANG, Y. et al. Urapidil improves the structure and function of right ventricle as determined by echocardiography in monocrotaline-induced pulmonary hypertension rat model. **Clinical Rheumatology**, v. 38, n. 1, p. 29–35, 18 jan. 2019.

WAXENBAUM, J. A.; VARACALLO, M. **Anatomy, Autonomic Nervous System**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2019.

WEBB, D. J. et al. Sildenafil improves renal function in patients with pulmonary arterial hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 235–241, 1 ago. 2015.

WEDGWOOD, S. et al. Role for Endothelin-1–Induced Superoxide and Peroxynitrite Production in Rebound Pulmonary Hypertension Associated With Inhaled Nitric Oxide Therapy. **Circulation Research**, v. 89, n. 4, p. 357–364, 17 ago. 2001.

WEDGWOOD, S. et al. Fibroblast growth factor-2 expression is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. **Pediatric Research**, v. 61, n. 1, p. 32–36, jan. 2007.

WEI, Y. et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 35137–35146, 17 nov. 2006.

WENSEL, R. et al. Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 4, p. 895–901, 1 out. 2009.

WHITE, R. J. et al. Clinical outcomes stratified by baseline functional class after initial combination therapy for pulmonary arterial hypertension. **Respiratory Research**, v. 20, n. 1, p. 208, 12 set. 2019.

WILLIAMS, M. C.; MOLYNEUX, R. J. Occurrence, Concentration, and Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids in Crotalaria Seeds. **Weed Science**, v. 35, n. 4, p. 476–481, jul. 1987.

WILSON, D. W. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 5–6, p. 307–325, 1992.

- WOLIN, M. S.; AHMAD, M.; GUPTE, S. A. **The sources of oxidative stress in the vessel wall**. *Kidney International*. **Anais...**Blackwell Publishing Inc., 2005.
- WU, F. et al. Protective effects of alopentine on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 632–641, 1 maio 2017.
- XU, D. et al. Resveratrol alleviate hypoxic pulmonary hypertension via anti-inflammation and anti-oxidant pathways in rats. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 12, p. 942–954, 23 nov. 2016.
- XU, W. et al. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 4, p. 1342–1347, 23 jan. 2007.
- XU, X. Q. et al. The efficacy and safety of sildenafil in Chinese patients with pulmonary arterial hypertension. **Hypertension Research**, v. 32, n. 10, p. 911–915, 31 jul. 2009.
- YAMAWAKI, H.; HAENDELER, J.; BERK, B. C. Thioredoxin: A Key Regulator of Cardiovascular Homeostasis **Circulation Research**, 28 nov. 2003.
- YAN, C. C.; HUXTABLE, R. J. Effect of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, on bile composition of the isolated, perfused rat liver. **Life Sciences**, v. 57, n. 6, p. 617–626, 30 jun. 1995.
- YAN, G. et al. Baicalin prevents pulmonary arterial remodeling in vivo via the AKT/ERK/NF- κ B signaling pathways. **Pulmonary Circulation**, v. 9, n. 4, 2019.
- YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411–415, 1988.
- YE, C.; RABINOVITCH, M. Inhibition of elastolysis by SC-37698 reduces development and progression of monocrotaline pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 261, n. 4 30-4, 1991.
- YI, E. S. et al. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension: A morphometric and immunohistochemical study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 4 I, p. 1577–1586, 2000.
- YIN, F. C. P.; SPURGEON, H. A.; RAKUSAN, K. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: Application in the aging rat. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 12, n. 6, 1982.
- YOSHIHARA, E. et al. Thioredoxin/Txnip: Redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases **Frontiers in Immunology**, 2013.
- YU, J. et al. Altered expression and signal transduction of endothelin-1 receptors in heritable and idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 2, p. 322–329, fev. 2013.
- YU, M. et al. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 5, p. 883–892, 1 maio 2011.
- ZALEWSKI, A.; SHI, Y. Vascular Myofibroblasts. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 17, n. 3, p. 417–422, mar. 1997.
- ZELT, J. G. E. et al. Medical Therapy for Heart Failure Associated With Pulmonary Hypertension. **Circulation Research**, v. 124, n. 11, p. 1551–1567, 24 maio 2019.
- ZHAO, Y. Y. et al. Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 2009–2018, 1 jul. 2009.
- ZHU, L. et al. The endogenous vascular elastase that governs development and progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats is a novel enzyme related to the serine proteinase adipsin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1163–1171, 1994.

ZHUANG, W. et al. Pulmonary arterial hypertension induced by a novel method: Twice-intraperitoneal injection of monocrotaline. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 12, p. 995–1003, 1 ago. 2018.

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

ZWEIER, J. L.; TALUKDER, M. A. H. Editorial: Targeting dimethylarginine dimethylaminohydrolases in pulmonary arterial hypertension: A new approach to improve vascular dysfunction? **Circulation**, 22 mar. 2011.

ANEXO 1 CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 32151

Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NO PULMÃO, CORAÇÃO E SANGUE, EM DIFERENTES TEMPOS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Vigência: 01/12/2016 à 01/12/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ADRIANE BELLO KLEIN - coordenador desde 01/12/2016
TANIA REGINA GATTELLI FERNANDES - Técnico de Laboratório desde 01/12/2016
Alexsandra Zimmer - Aluno de Doutorado desde 01/12/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 20/02/2017 - SALA 330 DO ANEXO - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 200 ratos machos Wistar de 180 g, provenientes do CREAL/UFRGS de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 3 de Março de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética