

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

Cristiane Dias Lisboa

**USO DA MELATONINA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR  
E SEUS EFEITOS SOBRE PARÂMETROS FUNCIONAIS  
DO VENTRÍCULO DIREITO E DA ARTÉRIA PULMONAR E  
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NO PULMÃO DE RATOS**

Porto Alegre

2024

Cristiane Dias Lisboa

**USO DA MELATONINA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR  
E SEUS EFEITOS SOBRE PARÂMETROS FUNCIONAIS  
DO VENTRÍCULO DIREITO E DA ARTÉRIA PULMONAR E  
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NO PULMÃO DE RATOS**

Dissertação 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 mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luz de Castro

Porto Alegre

2024

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força nos momentos mais difíceis.

Ao meu colega de trabalho Sergio Edgar Mattos, por ter sido o meu “padrinho” no PPG Fisiologia.

Ao meu orientador Alexandre Luz de Castro, meu agradecimento mais que especial, por ter me aceitado como sua orientanda, por toda a paciência, compreensão e aprendizado ao longo deste trabalho. Alê, tu és o “melhor orientador do mundo”. Como você sempre me disse: “Vai dar tudo certo”. Saiba que teu apoio foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado, José Luciano Maciel, por todo o apoio, incentivo, ajuda e paciência ao longo desta etapa. Teu carinho foi essencial para renovar minha esperança.

Aos colegas de laboratório de Fisiologia Cardiovascular (UFRGS), em especial à Vanessa Duarte Ortiz, Isabel Cristina Teixeira Proença, Ramison dos Santos e Silvio Tasca.

Agradeço também a Tânia Regina Gateli pelo carinho, atenção e suporte técnico prestado aos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

Aos professores do laboratório Adriane Belló-Klein, Alex Sander Araujo e Cristina Campos Carraro pelo incentivo e ajuda.

Também quero agradecer as professoras Maria Flávia Marques Ribeiro e Eloisa Loss pelos ensinamentos e dedicação com os alunos.

Aos meus familiares pela torcida e apoio. Amo vocês!

Ao PPG Fisiologia, pela elevada qualidade do ensino oferecido.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade e suporte para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que fizeram parte direta ou indiretamente deste trabalho.

## RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é caracterizada por remodelação vascular, obstrução arterial pulmonar e resistência vascular pulmonar elevada, resultando em uma sobrecarga do ventrículo direito (VD) e levando a uma insuficiência cardíaca e morte. Um dos principais estímulos para o processo de remodelação vascular são os danos oxidativos mediados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e os processos inflamatórios. Estudos sugerem que a melatonina devido aos seus efeitos antioxidantes, possa desempenhar um papel importante na HAP. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da melatonina sobre os parâmetros morfológicos e funcionais do VD e da artéria pulmonar e parâmetros de estresse oxidativo no pulmão de ratos com HAP. Para esse estudo foram utilizados ratos machos Wistar, com 45 dias de idade divididos em três grupos: Controle (CTR); Monocrotalina (MCT); Monocrotalina + Melatonina (MCT + MEL). O protocolo experimental teve duração de 21 dias. A HAP foi induzida com uma única injeção intraperitoneal de MCT (60mg/kg) no primeiro dia do protocolo experimental. O tratamento com melatonina (10mg/kg) teve início a partir do segundo dia e foi até o último dia de protocolo, quando os animais foram eutanasiados logo após a ecocardiografia. Os animais que receberam MCT apresentaram uma diminuição no tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar (TAC) e na razão (TAC/TEJ). O tempo de ejeção (TEJ) do sangue para a artéria pulmonar e o diâmetro arterial na sístole não demonstraram diferença entre os grupos. No que se refere aos parâmetros sistólicos e diastólicos analisados, o TAPSE se mostrou reduzido no grupo MCT indicando um prejuízo na função contrátil do VD. Para este parâmetro, a melatonina preveniu uma piora da contratilidade do VD, apesar da resistência aumentada. A FAC (%), a frequência cardíaca, o débito sistólico e o Pico E não se mostrou diferente entre os grupos, ao contrário do Pico A, que nos animais afetados pela HAP está aumentado. Observamos menos ganho de peso corporal e hepático, congestão pulmonar e hipertrofia do VD nos animais que receberam MCT. Com relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados no tecido pulmonar, os animais com HAP apresentaram uma redução nos níveis de ROS. Sobre os níveis de TBARS, nitritos e xantina oxidase, não ocorreram diferenças entre os grupos. Quanto aos parâmetros antioxidantes analisados, os níveis de sulfidrilas e a atividade da enzima catalase, não apresentaram diferenças entre os grupos. Nossos resultados sugerem que a melatonina é de interesse na HAP, porém são necessários mais estudos sobre o seu papel protetor e seu potencial terapêutico, abrindo novas perspectivas na prevenção e tratamento desta doença.

## ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by vascular remodeling, pulmonary arterial obstruction and elevated pulmonary vascular resistance, resulting in right ventricular (RV) overload heart failure and death. One of the main stimuli for the vascular remodeling process is oxidative damage mediated by reactive oxygen species (ROS) and inflammatory processes. Studies suggest that, due to its antioxidant effects melatonin may play an important role in PAH. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of melatonin on the morphological and functional parameters of the RV and pulmonary artery as well as oxidative stress parameters in the lungs of rats with PAH. For this study, male Wistar rats, 45 days old, were divided into three groups: Control (CTR); Monocrotaline (MCT); and Monocrotaline + Melatonin (MCT + MEL). The experimental protocol lasted 21 days. PAH was induced with a single intraperitoneal injection of MCT (60mg/kg) on the first day of the experimental protocol. Treatment with melatonin (10mg/kg) began on the second day and continued until the last day of the protocol, when the animals were euthanized immediately after echocardiography. Animals that received MCT showed a decrease in the acceleration time of blood flow through the pulmonary artery (TAC) and in the ratio (TAC/TEJ). The ejection time (TEJ) of blood to the pulmonary artery and the arterial diameter in systole showed no difference between the groups. Regarding the analyzed systolic and diastolic parameters, TAPSE was reduced in the MCT group, indicating impaired contractile function of the in RV. For this parameter, melatonin prevented a worsening of RV contractility, despite increased resistance. FAC (%), heart rate, systolic output, and Peak E were not different among the groups, unlike Peak A, which was increased in animals affected by PAH. We observed less body weight gain and hepatic growth, pulmonary congestion and RV hypertrophy in animals that received MCT. In relation to oxidative stress parameters evaluated in lung tissue, animals with PAH showed a reduction in ROS levels. Concerning the levels of TBARS, nitrites and xanthine oxidase there were no differences among the groups. As for the antioxidant parameters analyzed, the levels of sulfhydryl and catalase enzyme activity showed no differences among the groups. Our results suggest that melatonin is of interest in PAH, however further studies are needed to explore its protective role and therapeutic potential, opening new perspectives for the prevention and treatment of this disease.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação clínica da HP estabelecida no 6º Simpósio de HP

Figura 2 – Remodelação Vascular Pulmonar na HAP

Figura 3 – Histopatologia representativa de um vaso pulmonar na HAP

Figura 4 – Remodelamento do ventrículo direito

Figura 5 – *Crotalaria spectabilis*

Figura 6 – Modelo experimental de HAP induzida por MCT

Figura 7 – Representação dos grupos experimentais e protocolo experimental

Figura 8 – Medidas do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar

Figura 9 – Análises ecocardiográficas do VD

Figura 10 – Análises morfométricas

Figura 11 – Análises bioquímicas

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Definições hemodinâmicas de hipertensão pulmonar

Tabela 2 – Parâmetros ecocardiográficos da artéria pulmonar

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AD** – átrio direito

**AE** – átrio esquerdo

**AP** – artéria pulmonar

**ATP** – adenosina trifosfato

**BMPR2** – receptor da proteína morfogenética óssea tipo 2

**CAT** – catalase

**CTR** – controle

**DC** – débito cardíaco

**DCFH – DA** – diclorofluoresceína diacetato

**DCF** – diclorofluoresceína

**DNA** – ácido desoxirribonucleico

**eNOS** – óxido nítrico sintase endotelial

**ET- 1** – endotelina-1

**ETA** – receptor da endotelina tipo A

**ETB** – receptor da endotelina tipo B

**FAC** – mudança na área fracional

**FC** – frequência cardíaca

**GMPc** – monofosfato cíclico de guanosina

**GO** – glutational oxidase

**GPx** – glutational peroxidase

**GR** – glutational redutase

**HAP** – hipertensão arterial pulmonar

**HAPI** – hipertensão arterial pulmonar idiopática

**HP** – hipertensão pulmonar

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio



**HNO<sub>2</sub>** – ácido nitroso

**HO<sub>2</sub><sup>-</sup>** – radical hidroperoxila

**IL - 1** – interleucina 1

**IL - 2** – interleucina 2

**IL - 6** – interleucina 6

**IL - 8** – interleucina 8

**MCT** – monocrotalina

**MEL** – melatonina

**NADPH** – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases

**NO** – óxido nítrico

**NOS** – óxido nítrico sintase

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** – nitritos

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** – nitratos

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** – óxido nitroso

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – radical superóxido

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>** – oxigênio singlet

**OH<sup>-</sup>** – radical hidroxila

**ONOO<sup>-</sup>** – peroxinitrito

**PAP** – pressão arterial pulmonar

**PAP<sub>m</sub>** – pressão arterial pulmonar média

**PDE5** – fosfodiesterase do tipo 5

**PGI<sub>2</sub>** – Prostaciclina

**PICO A** – sístole atrial

**PICO E** – velocidade de enchimento do VD

**POCP** – pressão de oclusão capilar pulmonar

**Prxs** – peroxirredoxinas

**RVP** – resistência vascular pulmonar

**ROS** – espécies reativas de oxigênio

**SOD** – superóxido dismutase

**TAC** – tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar

**TBARS** – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TEJ** – tempo de ejeção

**TAPSE** – plano de excursão sistólica do anel da tricúspide

**TXA<sub>2</sub>** – tromboxano A<sub>2</sub>

**VD** – ventrículo direito

**VE** – ventrículo esquerdo

**XDH** – xantina desidrogenase

**XO** – xantina oxidase

## **LISTA DE SIGLAS**

**CGTRQ** – Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos

**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais

**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

**ICBS** – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

**REHAP** – Registro Espanhol de Hipertensão Arterial Pulmonar

**REVEAL** – The Registry to Evaluate Early and Long – term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management

**UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**U.S NIH** – United States National Institute of Health

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR.....	13
1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	16
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.4 FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	22
1.4.1 Remodelamento vascular pulmonar.....	22
1.4.2 Remodelamento do ventrículo direito.....	22
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	30
1.6 MELATONINA.....	35
1.7 MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDO POR MONOCROTALINA.....	37
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	41
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	43
4.2 CÁLCULO AMOSTRAL.....	43
4.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	44
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	44
4.5 ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS.....	45
4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	46
4.7 DESCARTE DE RESÍDUOS.....	47
4.8 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.....	47
4.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	47

4.9.1	Preparação tecidual e medição da concentração de proteínas.....	47
4.9.2	Avaliação de nitritos.....	48
4.9.3	Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	48
4.9.4	Determinação de grupos sulfidrila totais.....	48
4.9.5	Método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	49
4.9.6	Western blot.....	49
<b>5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
6.1	DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS.....	51
6.1.1	Fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar.....	51
6.1.2	Parâmetros ecocardiográficos do VD.....	53
6.2	ANÁLISES MORFOMÉTRICAS.....	55
6.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	57
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
	<b>ANEXO 1 CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA.....</b>	<b>82</b>

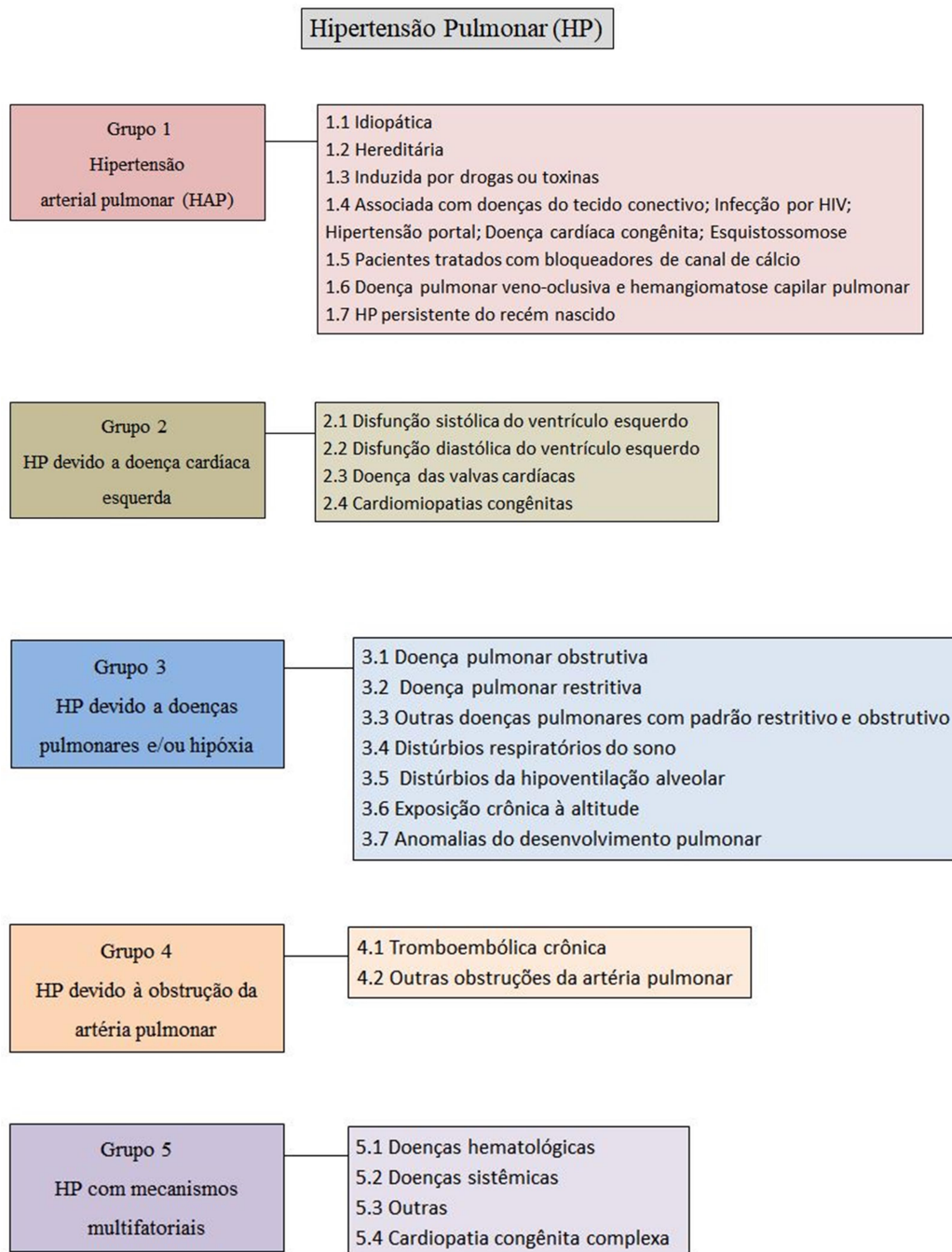
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR

A hipertensão pulmonar (HP) é uma patologia progressiva caracterizada por uma elevada pressão nas artérias pulmonares. Com o tempo, essa elevada pressão ocasiona uma sobrecarga e falência do ventrículo direito (VD) com consequências hemodinâmicas que podem acometer diretamente ou indiretamente a circulação pulmonar (MARTINS JUNIOR, 2014; ALVES; OLEAS; SOUZA, 2017). O aumento da pressão arterial pulmonar (PAP) ocorre por conta da vasoconstrição prolongada e o remodelamento excessivo da vasculatura pulmonar, ocasionando aumento na resistência vascular pulmonar (RVP) (TUDER et al., 2013). Evidências recentes sugerem que a HP esteja relacionada como uma complicação de várias doenças comuns, levando ao agravamento dos sintomas e consequente aumento da mortalidade (HOEPER et al., 2016).

Durante as últimas décadas, a definição e a classificação da HP foi sendo atualizada conforme novos estudos e informações clínicas foram sendo disponibilizadas (ALVES; OLEAS; SOUZA, 2017). De acordo com o 6º Simpósio Mundial de HP, ocorrido em 2018, na cidade de Nice, na França, novos ajustes foram feitos na definição e na classificação da HP (CONDON et al., 2019). A HP clinicamente é classificada em cinco grupos, conforme evidenciado na figura 1, com base na sua etiologia, fisiopatologia, características hemodinâmicas e conduta terapêutica (FERNANDES et al., 2021; SAHAY, 2019).

O grupo 1, hipertensão arterial pulmonar (HAP), caracteriza-se por apresentar um remodelamento patológico da vasculatura pulmonar, aumento da RVP e insuficiência do VD. O grupo 2, HP devido a doença cardíaca esquerda, ocorre por doença cardíaca valvar, aumento da pressão no átrio esquerdo (AE) ou insuficiência cardíaca sistólica ou diastólica. O grupo 3, HP devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia, se dá por doenças pulmonares crônicas ou hipóxia. O grupo 4, HP devido à obstrução da artéria pulmonar (AP), é decorrente de uma remodelação vascular ou embolia pulmonar. E o grupo 5, HP com mecanismos multifatoriais, abrange pacientes sem mecanismos identificados para o desenvolvimento da HP envolvendo vários fenômenos fisiopatológicos (SAES/MS, 2023).



**Figura 1** – Classificação clínica da HP estabelecida no 6º Simpósio de HP. HP: hipertensão pulmonar (adaptada e modificada de SIMONNEAU et al, 2019).

Também neste 6º Simpósio Mundial de HP, ficou estabelecido que a condição hemodinâmica que define a HP, é uma pressão arterial pulmonar média (PAPm) superior a 20 mmHg. Em indivíduos saudáveis, a PAPm normal é de aproximadamente  $14 \pm 3,3$  mmHg em repouso. Estudos recentes sugerem que indivíduos com PAPm entre 21-24 mmHg apresentam

maior risco de desenvolverem HP (SAHAY, 2019). No entanto, a PAPm > 20 mm Hg de forma isolada, não é suficiente para definir uma doença vascular pulmonar. A elevação da PAP pode ter causas diversas, como por exemplo, um aumento do débito cardíaco (DC) ou uma hiperviscosidade (SIMONNEAU et al, 2019).

Sendo assim, outras medidas hemodinâmicas foram acrescentadas nessa definição, como pressão de oclusão capilar pulmonar (POCP) e RVP (CONDON et al., 2019; SIMONNEAU et al, 2019). Então, de acordo com as variações das medidas hemodinâmicas, a HP pode ser subclassificada em pré – capilar, em pós – capilar e na combinação de pré e pós – capilar, conforme apresentadas na tabela 1 (CONDON et al., 2019; SAHAY, 2019; SIMONNEAU et al,2019).

**Tabela 1. Definições hemodinâmicas de hipertensão pulmonar**

Definições		HP pré - capilar	HP pós capilar isolada	HP pré e pós – capilar combinada
Características	PAPm	> 20 mm Hg	> 20 mm Hg	> 20 mm Hg
	POCP	≤ 15 mm Hg	> 15 mm Hg	> 15 mm Hg
	RVP	≥ 3 WU	< 3 WU	≥ 3 WU

Fonte: adaptado e modificado de CONDON e colaboradores, 2019. HP: hipertensão pulmonar; PAPm: pressão arterial pulmonar média; POCP: pressão de oclusão capilar pulmonar; RVP: resistência vascular pulmonar; WU: unidades Wood.

Apesar de a HP ser reconhecida por complicar muitas doenças comuns, alguns subgrupos são considerados raros. Independentemente da doença de base, o desenvolvimento da HP está associado ao agravamento dos sintomas e à redução da sobrevida. Por este motivo, médicos, pesquisadores e a indústria farmacêutica tem se atentado a estas formas de HP, principalmente a HAP e HP tromboembólica crônica (HOEPER et al., 2016). O melhor exame não invasivo para iniciar a investigação da doença é o ecocardiograma. Se o ecocardiograma apresentar sinais sugestivos de HP, a confirmação de dará com a realização do cateterismo cardíaco direito (CALDERARO et al., 2019; SAHAY, 2019).



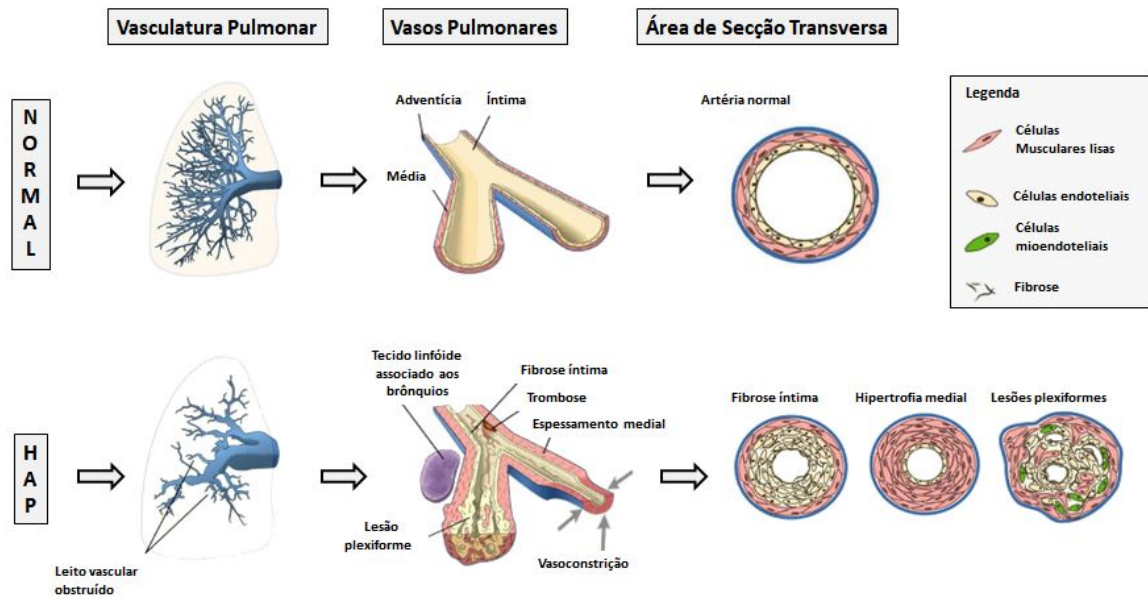
## 1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Dentre as cinco categorias de HP, a HAP corresponde ao grupo 1, sendo ainda subcategorizada de acordo com a sua etiologia, como evidenciado na figura 1. Pode ser idiopática, sem causa aparente e nem histórico familiar; hereditária, quando ocorre mutações no receptor da proteína morfogenética óssea tipo 2 (BMP2); induzida por toxinas e medicamentos; associada com doenças do tecido conectivo, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), esquistossomose, associada à hipertensão portal, doenças cardíacas congênitas; doença pulmonar veno-oclusiva, hemangiomatose capilar pulmonar e HP persistente do recém nascido (ALVES; OLEAS; SOUZA, 2017). A maioria dos casos compreende a HAP idiopática (HAPI) (LAN et al.,2018).

A HAP é uma doença rara, grave, incurável e progressiva. Compreende diversas doenças que resultam em um remodelamento e aumento da RVP (FERNANDES et al.,2021.; SAHAY, 2019). Abrange pacientes com HP pré-capilar devido à vasculopatia pulmonar angioproliferativa que afeta predominantemente as arteríolas pré-capilares (HOEPER et al., 2016; SAES/MS, 2023).

Em todas as formas de HP, a vasculopatia progressiva vem acompanhada de um desequilíbrio entre vasodilatadores, como o óxido nítrico (NO) e Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e vasoconstritores como a endotelina – 1 (ET-1) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Estudos demonstram que há uma tendência à vasoconstrição na HAP (LAI et al., 2014; BARRETO et al., 2005).

A principal característica da HAP é o remodelamento obstrutivo das artérias pulmonares, porém a vasoconstrição pulmonar também é um fator importante na fisiopatologia da HAP, com aumento do tônus vascular e proliferação de células musculares lisas das arteríolas, como evidenciado na figura 2 (SIMONNEAU et al, 2019.; FERNANDES et al.,2021). A combinação de disfunção endotelial, proliferação e remodelação de células endoteliais e musculares lisas é o que leva ao estreitamento progressivo dos vasos sanguíneos pulmonares, resultando em uma resistência aumentada ao fluxo sanguíneo e aumento na pressão da artéria pulmonar (LAN et al, 2018.; LAI et al, 2014).



**Figura 2** – Remodelação Vascular Pulmonar na HAP. HAP: hipertensão arterial pulmonar (adaptado de Ryan et al., 2015).

A elevação da resistência vascular pulmonar pode ocasionar uma sobrecarga ao VD resultando em uma insuficiência cardíaca direita, que é a principal causa dos sintomas associados à doença (FERNANDES et al., 2021). A insuficiência do VD na HAP representa uma resposta inadequada ao aumento da pós-carga. Retrata a incapacidade desta câmara cardíaca em perfundir adequadamente a circulação pulmonar para garantir o enchimento do ventrículo esquerdo (VE) e manter as pressões diastólicas normais. A diminuição do índice cardíaco e aumento das pressões de enchimento cardíaco do lado direito são características de falha no VD (RYAN et al., 2015). O remodelamento vascular pulmonar e a hemodinâmica vascular pulmonar alterada desempenham um papel importante na patologia vascular do pulmão (TUDER et al., 2007).

Os sinais e sintomas da HAP são bastante semelhantes aos de outras doenças, o que pode levar ao atraso no diagnóstico. Sintomas como dispneia, fadiga, fraqueza, angina, cianose entre outros, são manifestações clínicas presentes não só na HAP, mas também em outras patologias, fazendo com que muitas vezes, o diagnóstico seja realizado em fases tardias da doença (MARTINS JUNIOR, 2014.; RUFINO et al, 2013). O principal sintoma da HAP é a dispneia ao esforço. Pacientes com evidência de insuficiência cardíaca direita progressiva, pressão atrial direita elevada, débito cardíaco baixo e episódios de hipoperfusão sistêmica

com angina ou síncope, possuem maior risco de morte. A dispneia e a falta de ar são causadas principalmente pela incapacidade de aumentar o débito cardíaco (LAI et al, 2014).

Em situação fisiológica, o fluxo sanguíneo nos capilares pulmonares é um processo dinâmico. Em pacientes com HAP, a quantidade de alvéolos perfundidos de forma adequada, torna-se reduzido, devido à progressão do remodelamento vascular. Essa ineficiência ventilatória progressiva causa alterações na relação ventilação-perfusão necessitando de aumento na ventilação para obter uma oxigenação adequada, causando a dispneia. Em estágios mais avançados, a diminuição do débito cardíaco acentua a redução da oxigenação, colaborando para situações de hipóxia inicialmente durante o exercício e posteriormente em situações de repouso. É por este motivo que inicialmente essas alterações na vasculatura pulmonar não estão associadas a sintomas e somente quando mais de 40% da vascularização pulmonar é afetada é que se iniciam os sintomas de dispneia aos esforços (DELGADO; PÉREZ; SUBÍAS, 2019).

O tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico é de aproximadamente dois anos. Isso faz com que a doença seja diagnosticada em estágios mais avançados prejudicando a possibilidade de intervenção em estágios iniciais da doença (ALVES; OLEAS; SOUZA, 2017). A HAP é diagnosticada por meio de cateterismo cardíaco direito, quando a PAPm estiver  $\geq 25$  mmHg, a POCP  $\leq 15$  mmHg e RVP  $> 2$  unidades Wood (SAES/MS, 2023.; SIMONNEAU et al, 2019). Embora o limiar da PAPm seja de 20 mmHg para diagnóstico da HP, estudos clínicos sugerem que o tratamento da HAP deve ser iniciado quando a PAPm estiver  $\geq 25$ mmHg (CALDERARO et al., 2019.; SAES/MS, 2023).

O ecocardiograma Doppler é uma forma não invasiva de avaliação da estrutura e função do VD. Há uma série de medições que podem ser realizadas com a ecocardiografia. Entre elas, podemos destacar o tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar, o tempo de ejeção do sangue para a artéria pulmonar, o diâmetro arterial na sístole, a excursão sistólica do anel da tricúspide, a velocidade de enchimento do VD, grau de desvio do septo interventricular e o débito cardíaco. A ecocardiografia também pode ser utilizada para estimar a RVP pela razão entre o fluxo de sangue e o tempo de ejeção do VD na artéria pulmonar (LAI et al., 2014; CALDERARO et al., 2019).

É fundamental o diagnóstico hemodinâmico e a classificação de sua etiologia para se obter um tratamento adequado (FERNANDES et al.,2021; SAES/MS, 2023). Apesar das

terapias disponíveis para o tratamento da HAP, ela continua sendo uma condição incurável (CALDERARO et al., 2019; LAU et al., 2017).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA

A epidemiologia da HP é mais difícil de ser estudada se comparada com a hipertensão sistêmica. Isso por conta de que o diagnóstico requer cateterismo cardíaco direito. Por ser um procedimento invasivo, não se torna muito viável e nem ético a sua realização para estudos populacionais em grande escala (HOEPER et al., 2016).

Nos últimos 30 anos vários registros coletaram dados sobre características demográficas, clínicas e hemodinâmicas de pacientes acometidos pela HAP. Estes registros forneceram importantes informações sobre a epidemiologia de pacientes com HAP auxiliando no desenvolvimento de indicadores prognósticos da doença (HOEPER; GIBBS, 2014).

Um estudo realizado em Ontário, no Canadá entre 1993 e 2012, revelou que a incidência e prevalência de HP em adultos aumentaram significativamente ao longo do tempo (WIJERATNE et al., 2018).

A prevalência da HP é cerca de 1% da população global, podendo atingir pessoas de todas as faixas etárias, com uma prevalência maior em idosos. (WIJERATNE et al., 2018; HOEPER et al., 2016).

A HAP afeta cerca de 30 milhões de pessoas no mundo (SISNIEGA; ZAYAS; PULIDO, 2019), com incidência de 1,1-7,6 por milhão de adultos por ano, e prevalência de 15-50 por milhão de adultos (ALVES; OLEAS; SOUZA, 2017; LAU et al, 2017). A HAPI é o subtipo mais comum de HAP, representando 30-50% de todos os casos de HAP (LAU et al., 2017). Só nos Estados Unidos, aproximadamente 15.000 mortes a cada ano são atribuídas à HAP (DESAI; CHANNICK, 2008).

O Registro Espanhol de Hipertensão Arterial Pulmonar (REHAP), apontou que entre o período de 1998 e 2008 a sobrevida dos pacientes diagnosticados com HAPI foi de 89% e 77% em 1 e 3 anos, respectivamente (ESCRIBANO – SUBIAS et al., 2012).

Em outro estudo realizado na Austrália e na Nova Zelândia entre 2012 e 2016, pacientes diagnosticados com HAP, tiveram taxa de sobrevivência estimada em 1 (96%) e 3 anos (77%), indicando que a HAP é uma doença associada a uma taxa significativa de mortalidade precoce (STRANGE et al., 2017).

Além de ser uma doença com alta mortalidade, a HAP afeta principalmente mulheres. Estudos demonstram que o sexo feminino possui um fator de risco mais elevado na patogênese da doença. Isso se deve por conta dos níveis de estrogênio e de mutações no gene que codifica o receptor da proteína morfogenética óssea tipo II (BMP2). Alguns estudos sugerem que mulheres mais jovens tendem a ter PAPm e RVP mais altas em comparação com mulheres mais velhas, pressupondo que a idade e a transição da menopausa são potenciais modificadores de risco nas doenças cardiovasculares e que os efeitos do estrogênio na vasculatura são variáveis dependendo da idade. Apesar de o estrogênio estar relacionado com o favorecimento da doença, as mulheres apresentam melhores resultados se comparado com os homens. Níveis de testosterona estão associados à hipertrofia e fibrose do VD, o que pode explicar resultados piores em homens. Os mecanismos que levam as mulheres a terem melhores resultados com a doença do que os homens, ainda são pouco compreendidos (LAN et al., 2018.; VENTETUOLO et al., 2014; LAU et al., 2017).

Nos últimos anos, registros como o do REVEAL (The Registry to Evaluate Early and Long – term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management) e do COMPERA (Comparative, Prospective Registry of Newly Initiated Therapies for Pulmonary Hypertension), apontam mudanças no perfil dos pacientes diagnosticados com HAP. Dentre essas mudanças, se encontra um número crescente de pacientes idosos sendo diagnosticados com HAPI (FROST et al., 2011; HOEPER et al., 2013; MCGOON et al., 2013). Não é incomum ter pacientes sendo diagnosticados com HAPI na faixa dos setenta, oitenta e até mesmo noventa anos.

Uma das explicações para essas mudanças pode estar associada ao envelhecimento da maioria da população dos países ocidentais. Somado a isso, alguns pacientes podem ter sido mal diagnosticados no passado (LAU et al., 2017; HOEPER et al., 2013; MCGOON et al., 2013).

Outra explicação pode ser as alterações que ocorreram na classificação da HP, que levaram à inclusão de um espectro variado de pacientes nos últimos registros. A presença de

múltiplas comorbidades em idosos também pode acabar mascarando os sintomas da HAP sendo responsáveis pelo diagnóstico tardio (HOEPER; GIBBS, 2014).

O registro da Rede Francesa de HAP mostrou que entre 2002 e 2003, o atraso entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 27 meses (HUMBERT et al., 2006). No registro chinês entre 1999 e 2004, a duração média do início dos sintomas até o diagnóstico foi de 26,4 e 27,6 meses (JING et al., 2007).

Dados provenientes do Hemisfério Sul são mais escassos, dificultando a comparação com outros registros publicados. De acordo com um estudo realizado em um centro de referência no Brasil entre 2008 e 2013, a média de idade dos pacientes, foi de 46 anos. Neste mesmo estudo, aproximadamente 20% dos pacientes apresentaram HAP associada à esquistossomose, como a terceira forma mais importante, depois da HAPI e da HAP associada com doenças do tecido conectivo. A esquistossomose é uma doença correlacionada a más condições sanitárias, muito característica de países em desenvolvimento. Apesar de muitos casos permanecerem sem diagnóstico, a esquistossomose pode ser uma das principais causas de HAP afetando cerca de 200 milhões de pessoas no mundo (ALVES JR et al., 2015).

Em outro estudo realizado no Uruguai, entre 2006 e 2016, a média de idade dos pacientes também foi de 46 anos. Os tipos de HAP mais predominantes foram a HAPI, a HAP associada à doença cardíaca congênita e HAP associada com doenças do tecido conectivo (GRUSS et al., 2019).

Muitas questões importantes ainda permanecem sem resposta, e serão necessários mais dados de registros para abordar novas questões e entender melhor a HP. Desde o primeiro registro de HAP criado em 1981 pelo National Institutes of Health (U.S NIH Registry), nos Estados Unidos, informações coletadas de registros nacionais e internacionais obtiveram importantes informações sobre a apresentação e a história natural da doença, fornecendo informações sobre fatores demográficos, mudanças no fenótipo, tratamento e sobrevivência dos pacientes.

Estes diferentes registros permitiram comparações entre populações em diferentes épocas e localidades. Por esta razão, os registros têm sido de grande utilidade para melhor compreensão da HP (MCGOON et al., 2013).

## 1.4 FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

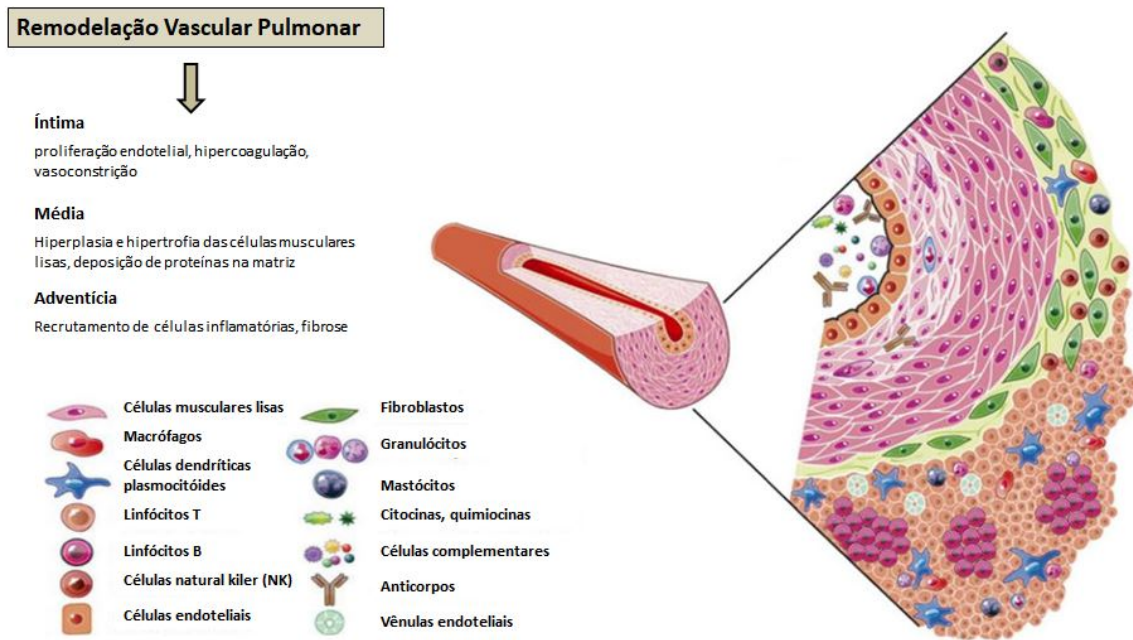
Independente da sua etiologia, os pacientes com HAP apresentam alterações patológicas semelhantes. Essas alterações patológicas incluem disfunção endotelial, remodelamento e proliferação de células musculares lisas e endoteliais, aumento da contratilidade das arteríolas pulmonares e trombos *in situ* (MA et al., 2016; LAN et al., 2018; GEWEHR et al., 2019).

A ineficácia dos vasodilatadores e as inúmeras lesões sofridas pelas células das artérias pulmonares ocasionam alterações em seu fenótipo, tornando-as resistentes a apoptose e extremamente proliferativas, resultando em estreitamento e oclusão grave no seu lúmen (ABE et al., 2016). Com isso, progressivamente ocorre um aumento da RVP, acometendo diversas artérias e arteríolas (OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2022). O aumento progressivo da RVP irá resultar em uma hipertrofia do VD, progredindo para uma insuficiência cardíaca e morte (GEWEHR et al., 2019).

### 1.4.1 Remodelamento vascular pulmonar

A HAP é caracterizada por apresentar lesões constrictivas, como espessamento da túnica íntima e adventícia, hipertrofia medial e lesões plexiformes (SANTOS - RIBEIRO et al., 2016). Na HAP a remodelação vascular é um processo multifatorial e multicelular envolvendo mudanças no diâmetro do lúmen e alterações em processos celulares (AGGARWAL et al., 2013). Esse processo de remodelação envolve inflamação e desequilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular (ZHANG et al., 2017).

Durante o seu desenvolvimento, são encontrados diferentes tipos de células nas paredes arteriais pulmonares (figura 3) como células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas, linfócitos T, linfócitos B, mastócitos, macrófagos, etc. (DELGADO; PÉREZ; SUBÍAS, 2019).



**Figura 3** – Histopatologia representativa de um vaso pulmonar na HAP. HAP: hipertensão arterial pulmonar (adaptado de Rabinovitch et al., 2014).

Vários estudos sugerem que as células T, dão o início ao processo de remodelação vascular, visto que foram encontradas precedendo o desenvolvimento de remodelação arterial pulmonar. Em estágios iniciais da doença observa-se um aumento significativo de estresse oxidativo e de processos inflamatórios causando danos irreversíveis ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e morte celular. Isso ocasiona lesões endoteliais e aumento de resposta inflamatória, podendo ser a causa subjacente da vasoconstrição excessiva e proliferação de células vasculares, contribuindo para o remodelamento vascular pulmonar oclusivo, característico da HAP (VAILLANCOURT et al., 2015).

Evidências sugerem que tanto as células vasculares pulmonares quanto as células inflamatórias são importantes fontes locais de quimiocinas e citocinas que podem levar ao remodelamento vascular pulmonar. Diversas citocinas podem controlar diretamente a proliferação celular, migração e diferenciação de células vasculares pulmonares. O aumento da expressão destas quimiocinas e citocinas pode contribuir para a contratilidade excessiva e a proliferação destas células vasculares (RABINOVITCH et al., 2014).

Níveis significativamente elevados de interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6) e interleucina (IL-8), são encontrados no soro de pacientes com HAP.



Um papel importante da IL-2 é promover a proliferação de células T e induzir a expressão da endotelina -1 promovendo vasoconstrição, que é um fator patológico chave na HAP. Estudos mostram que a IL-6 e IL-8 podem afetar diretamente a remodelação vascular, modulando a função do músculo liso e das células endoteliais, estando fortemente implicadas neste processo de remodelação vascular (SOON et al, 2010). Entre as citocinas pró-inflamatórias multifuncionais, a IL-6 é a mais proeminente, sendo associada à patogênese da HAP. A IL-1 pode estimular o fator de crescimento de fibroblastos. Ambas desempenham um papel integral na mediação da resposta proliferativa nas células musculares lisas e nos fibroblastos da vasculatura pulmonar. O fato de a inflamação preceder o remodelamento vascular na HAP sugere que a alteração da imunidade seja uma causa e não uma consequência da doença vascular (RABINOVITCH et al., 2014). A desregulação significativa nos níveis de citocinas inflamatórias é parte importante da resposta inicial à lesão, contribuindo para o processo de remodelação vascular na HAP (SOON et al, 2010).

O endotélio vascular é uma camada de células que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. Possui uma interface estrategicamente situada entre a circulação e o restante da parede vascular (BATLOUNI, 2001). O endotélio tem como função fornecer uma barreira semipermeável entre os compartimentos de fluido vascular e extravascular. Está intimamente envolvido na regulação do tônus, crescimento e diferenciação vascular (AGGARWAL et al., 2013). As diferentes células que compõem a parede vascular pulmonar podem utilizar mecanismos diversos para modular respostas metabólicas e funcionais ao estresse ou lesões (ZHANG et al., 2017). O endotélio pode responder a lesões de diversas maneiras afetando o processo de remodelação vascular (AGGARWAL et al., 2013). Lesões no endotélio podem expor as células musculares subjacentes a fatores de crescimento, estimulando a proliferação celular (MCLAUGHLIN et al., 2009). Esses fatores de crescimento assumem um papel importante nos processos de remodelação vascular, pois em resposta a eles, as células endoteliais e musculares lisas das artérias pulmonares podem crescer, proliferar, migrar ou se diferenciar (SANTOS - RIBEIRO et al., 2016). A integridade do endotélio é fundamental na regulação do fluxo sanguíneo, do tônus vascular e na estrutura dos vasos. O endotélio intacto controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas e até mesmo de células. Além de manter a fluidez do sangue, modula a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas e humorais locais e a própria estrutura vascular (BATLOUNI, 2001). Na HAP o endotélio tem como característica a produção aumentada de compostos vasoconstritores/mitogênicos e uma

deficiência na produção de vasodilatadores (MCLAUGHLIN et al., 2009). O desequilíbrio destes mediadores vasoativos desempenha um papel crucial no desenvolvimento e progressão das alterações patológicas proliferativas na HAP (PARIKH; BHARDWAJ; NAIR, 2019).

O NO liberado pelas células endoteliais, é um potente vasodilatador pulmonar e inibidor da ativação plaquetária e da proliferação de células musculares lisas na vasculatura. É produzido por três isoformas de óxido nítrico sintase (NOS). Uma vez formado, seus efeitos são amplamente mediados pelo monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que é rapidamente inativado pela fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5), presente em grandes quantidades no pulmão. O GMPc causa relaxamento das células musculares lisas da artéria pulmonar por meio de proteínas quinases dependentes de GMPc. Pacientes com HAP apresentam redução da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e aumento da expressão da PDE5 que degrada o GMPc. A resultante diminuição do GMPc está implicada no remodelamento vascular pulmonar adverso na HAP (THENAPPAN et al., 2018; MCLAUGHLIN et al., 2009). Portanto a diminuição da produção endotelial de NO e o aumento da expressão e atividade da PDE5 nas células do músculo liso da artéria pulmonar e no miocárdio do VD, são características patológicas importantes na HAP (ARCHER; MICHELAKIS, 2009). As células musculares lisas atuam na contração dos vasos sanguíneos e na regulação do tônus vascular, da pressão arterial e na distribuição do fluxo sanguíneo. Em condições fisiológicas normais, as células musculares lisas das artérias pulmonares são estáticas e diferenciadas, apresentando baixa proliferação (QIU et al., 2019). Para a regulação do tônus vascular, deve haver um equilíbrio entre os efeitos vasoconstritores e vasodilatadores gerados pelo endotélio ou que exercem influência sobre ele (FLORES VALDEZ, 2013).

Na HAP, a redução dos níveis de GMPc aumentam o cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular e o potássio ( $K^+$ ), provocando vasoconstrição, proliferação de células musculares lisas e resistência à apoptose (ARCHER; MICHELAKIS, 2009). O aumento de  $Ca^{2+}$  nas células musculares lisas das artérias pulmonares é um gatilho para a vasoconstrição e um estímulo para a hipertrofia do músculo liso (YUAN et al., 1998). Com isso, a camada de células musculares lisas na vasculatura pulmonar sofre uma variedade de alterações como, hipertrofia, hiperplasia e deposição de proteínas na matriz (AGGARWAL et al., 2013). Devido a essas alterações, essas células tornam-se proliferativas e resistentes à apoptose, apresentando síntese aprimorada e excelente plasticidade sob condições patológicas como anoxia e inflamação, contribuindo desta forma para o desenvolvimento da remodelação vascular. Essas células musculares lisas da vasculatura pulmonar de pacientes com HAP,

apresentam características semelhantes ao câncer, no que diz respeito à proliferação excessiva e resistência à apoptose (QIU et al., 2019). Para o remodelamento vascular na patogênese da HAP, o aumento da proliferação celular induzida por espécies reativas de oxigênio (ROS) e a diminuição da apoptose, são fatores que contribuem para os processos de hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas na vasculatura pulmonar (MA et al., 2016). O desequilíbrio entre esses dois processos é a principal causa do estreitamento das artérias pulmonares nesta patologia (SANTOS - RIBEIRO et al., 2016).

Na HAP a camada adventícia é fragmentada, permitindo a migração celular e a formação de peptídeos mitogênicos (MCLAUGHLIN et al., 2009). Os fibroblastos são os principais componentes presentes na adventícia, cujo papel é regular a função vascular através da produção contínua de matriz extracelular e proteínas matricelulares. Frequentemente são as primeiras células a serem ativadas a se proliferarem e se diferenciarem em resposta a lesões (ZHANG et al., 2017). Esses fibroblastos podem ativar macrófagos através de sinalização parácrina estimulando a expressão de genes implicados na inflamação crônica, remodelação tecidual e HAP. A inflamação vascular é em parte de natureza perivascular/adventicial, caracterizada por um influxo de leucócitos, principalmente macrófagos no compartimento adventício (EL KASMI, et al., 2014). A adventícia além de desempenhar um papel na regulação da função vascular pulmonar representa aproximadamente 15% do diâmetro externo das artérias pulmonares maiores que 15 mm de diâmetro. Na HAPI, a espessura da adventícia aumenta para 28% do diâmetro da artéria, por conta predominantemente da deposição de colágeno (TUDER et al., 2007).

#### 1.4.2 Remodelamento do ventrículo direito

A obstrução das artérias pulmonares ocasionada pela disfunção endotelial e o remodelamento vascular, resultam em aumento da RVP e das pressões pulmonares, o que causa insuficiência cardíaca direita e morte prematura (LAI et al, 2014.; RUFINO et al, 2013). A insuficiência cardíaca é uma condição fisiopatológica em que o coração é incapaz de bombear sangue em quantidade suficiente para o corpo ou o faz por meio de elevadas pressões de enchimento. Pode ocorrer devido a transtornos estruturais ou funcionais que prejudiquem a capacidade dos ventrículos de se encherem de sangue ou ejetarem sangue e

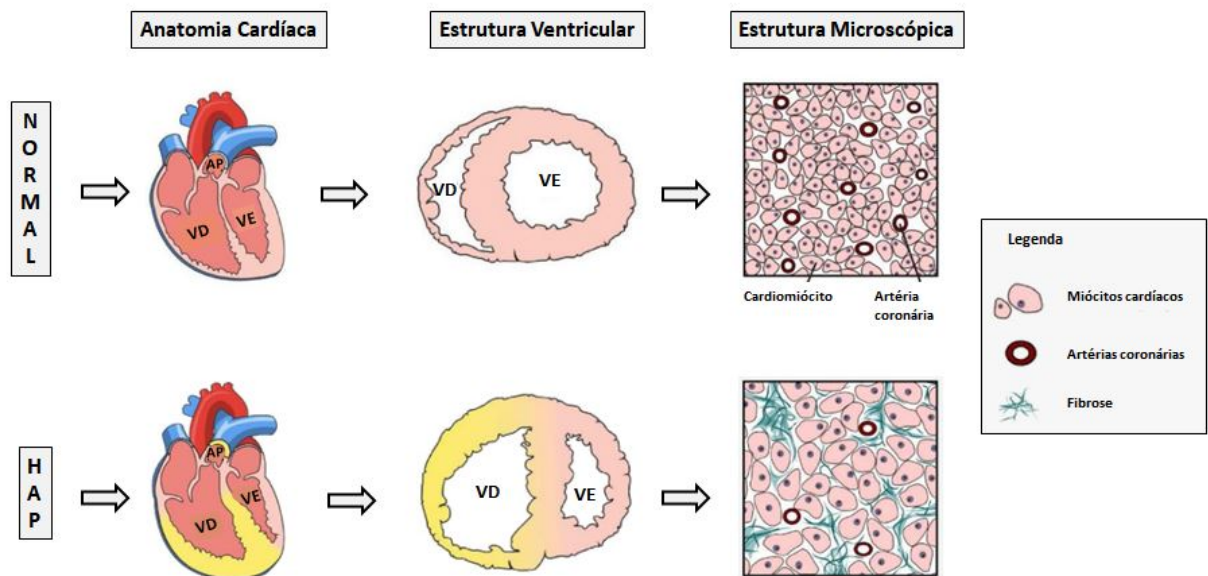
muitas vezes, se inicia com um evento de lesão no coração. Anormalidades mecânicas, distúrbios na frequência ou no ritmo, morte ou disfunção dos miócitos, remodelamento ventricular, anormalidades pulmonares ou a combinação destes fatores em geral, são causas da insuficiência cardíaca. Por se tratar de um processo progressivo, ao aparecer a disfunção ventricular, uma série de mecanismos compensatórios são ativados, mesmo que inicialmente benéficos, contribuem para a progressão do processo patológico a longo prazo. O remodelamento ventricular constitui um dos principais mecanismos pelos quais o coração compensa uma carga aumentada. Compreende alterações na massa, no volume, na forma e na composição (CLAUSELL; VIÉGAS, 2012).

O VD é morfológicamente e funcionalmente distinto do VE. O VD é uma estrutura em forma de meia-lua, apresenta paredes finas e está acoplado ao retorno venoso sistêmico de um lado e à circulação pulmonar do outro. Quando comparado ao VE, possui cardiomiócitos menores, mais colágeno e é cerca de 10% a 15% maior em volume com massa de um terço a um sexto menor (SANZ et al., 2019).

A insuficiência cardíaca direita é causada pela incapacidade do VD de manter a circulação ideal na presença de pré-carga adequada. Apesar de não existir uma definição hemodinâmica padronizada, a insuficiência do VD pode ser determinada por um índice cardíaco reduzido ( $< 2,5 \text{ L/min/m}^2$ ) e aumento da pressão de enchimento do VD (pressão atrial direita  $> 8 \text{ mmHg}$ ) (RYAN; ARCHER, 2014). O VD está conectado à circulação pulmonar de alta complacência e baixa resistência. Está adaptado para mudanças de volume e não de pressão. Em oposição, o VE está acoplado à circulação arterial sistêmica, de menor complacência e maior resistência. Adapta-se melhor às mudanças de pressão do que de volume (KONSTAM et al., 2018).

A primeira resposta adaptativa do VD à sobrecarga pressórica é a hipertrofia (figura 4). A hipertrofia cardíaca é o mecanismo de adaptação a estímulos mecânicos ou bioquímicos alterados no qual a sobrecarga pressórica exerce papel fundamental. Pacientes com parede do VD mais espessa, apresentam um perfil hemodinâmico caracterizado por maior pressão pulmonar e resistência vascular, apoiando o conceito de que o aumento sustentado do estresse na parede do VD é o principal estímulo desencadeador da hipertrofia (GHIO et al., 2011). Se não tratada, o VD dilata-se para compensar o aumento da pré-carga e manter o volume sistólico. Esse aumento extra no volume de enchimento diastólico final do VD irá ocasionar uma disfunção contrátil progressiva desta câmara, resultando em uma insuficiência cardíaca

do VD (MACHUCA; DE PERROT, 2015). O aumento agudo na pós-carga do VD pode diminuir subitamente o volume sistólico do mesmo (KONSTAM et al., 2018). Sob carga pressórica elevada, o aumento da pressão do VD desloca o septo interventricular para a esquerda, alterando a geometria do VE e prejudicando o seu enchimento, ocasionando menor volume diastólico final para o VE (SHEHATA et al., 2011). As alterações ocorridas na estrutura do VD exercem um efeito deletério sobre o VE, prejudicando o seu enchimento devido ao movimento anormal do septo interventricular e o comprometimento da tensão longitudinal e circunferencial desta câmara cardíaca, resultando em irregularidades diastólicas intrínsecas do miocárdio do VE (KISHIKI et al., 2019).



**Figura 4** – Remodelamento do VD. HAP: hipertensão arterial pulmonar; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo (adaptado de Ryan et al., 2015).

O VD possui uma morfologia complexa, com fibras musculares que correm predominantemente de forma longitudinal. Ao contrário do VE, a maior parte da contratilidade do VD ocorre no plano longitudinal com a base do VD movendo-se em direção ao ápice na sístole (SACHDEV et al., 2011). A adaptação da função do VD à HAP é inicialmente sistólica, com alterações diastólicas e dimensionais quando a contratilidade não consegue acompanhar à pós-carga (ERNANDE et al., 2013). A função sistólica do VD é extremamente sensível a alterações na pós-carga. Pequenos aumentos na pós-carga podem causar grandes diminuições no volume sistólico (KONSTAM et al., 2018).

Em um primeiro momento, a adaptação do VD se dá através da mecanotransdução, da capacidade intrínseca dos cardiomiócitos em detectar e responder à carga através das mudanças conformacionais nas integrinas, nos canais iônicos ativados por estiramento e na principal proteína sarcomérica, que é a titina. Sinais parácrinos dos fibroblastos cardíacos também são importantes (SANZ et al., 2019).

A hipertrofia do VD pode ser adaptativa ou mal adaptativa. Os pacientes com hipertrofia adaptativa podem permanecer estáveis por muitos anos, com um débito cardíaco e fração de ejeção do VD relativamente normal, estando associada à contratilidade preservada. Na hipertrofia mal adaptativa o débito cardíaco e a fração de ejeção do VD caem significativamente, fazendo com que esses pacientes descompensem rapidamente resultando em falência do VD. Neste caso, há também uma desregulação específica da câmara cardíaca do sistema nervoso autônomo, com dessensibilização e regulação negativa dos receptores alfa e beta e dopaminérgicos no VD (RYAN; ARCHER, 2015).

A função contrátil do VD é um importante prognóstico sobre o estágio da doença (LEATHER et al., 2006). Reduções na contratilidade do VD podem ser causadas por miocardite e isquemia. Pressões de enchimento elevadas no lado direito do coração também ocasionam congestão do seio coronário, reduzindo o fluxo sanguíneo coronário provocando isquemia do VD (KONSTAM et al., 2018).

Em estágios mais avançados da HAP, as alterações ocorridas no VD podem ser observadas por meio de diversas técnicas de imagem como a ecocardiografia, por exemplo. Dentre as alterações analisadas, inclui-se a dilatação do VD, contratilidade prejudicada e movimento paradoxal do septo interventricular com insuficiência cardíaca direita associada (KISHIKI et al., 2019). A dilatação cavitária do VD, com danos na cinética de enchimento diastólico do VE, contribui ainda mais para o mau funcionamento da bomba e consequentemente, para os sinais e sintomas da insuficiência cardíaca congestiva (MACHUCA; DE PERROT, 2015).

A insuficiência do VD na HAP pode causar edema pedal, distensão das veias jugulares, plenitude abdominal e dispneia aos esforços que é um indício de baixa sobrevida. A síncope por esforço é comum na HAP e reflete a incapacidade do VD de superar a obstrução vascular pulmonar e aumentar o débito cardíaco. Palpitações por taquicardia supraventricular refletem a distorção anatômica progressiva e o aumento do VD e do átrio direito (RYAN et

al., 2015). A insuficiência ventricular direita é a causa predominante de morte na HAP (BRITAIN et al., 2016).

### 1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Durante o processo de respiração celular o oxigênio utilizado para produzir energia é reduzido em um processo chamado de metabolismo oxidativo. A principal organela responsável por catalisar as etapas desse processo é a mitocôndria. Em cada uma dessas etapas há formação de subprodutos que, em sua maioria são benéficos. No entanto, alguns compostos podem ser tóxicos para a célula quando em altas concentrações (SILVA; JASIULIONIS, 2014).

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a ação dos sistemas de defesa antioxidante das células. Esse processo se dá em favor da geração excessiva de radicais livres e/ou na diminuição da capacidade das defesas antioxidantes. A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico com funções biológicas importantes. Durante os processos metabólicos da célula, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Quando produzidos em proporções apropriadas, possibilitam a geração de adenosina trifosfato (ATP), por intermédio da cadeia transportadora de elétrons. Porém, quando produzidos em excesso podem ocasionar a oxidação de biomoléculas, promovendo a perda de suas funções biológicas e causando danos oxidativos contra células e tecidos. Aos danos oxidativos causados pelo excesso de radicais livres, dá-se o nome de estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010).

Os radicais livres são frequentemente produzidos pelo organismo. São átomos ou moléculas que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, ou seja, possuem um ou mais elétrons desemparelhados. E este não emparelhamento de elétrons na última camada, tornam esses átomos ou moléculas altamente reativos podendo reagir facilmente com outras moléculas ao seu redor (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os mecanismos de geração de radicais livres podem ocorrer nas mitocôndrias, nas membranas celulares e no citoplasma. Por meio da cadeia transportadora de elétrons, a mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

A produção de radicais livres pode se dar em diferentes vias e situações. Pode ocorrer no metabolismo mitocondrial, na via do ácido úrico (enzima xantina oxidase), nos peroxissomos, em processos inflamatórios, em fagócitos, em situações de isquemia e durante exercícios físicos intensos. Fatores externos também podem influenciar nestes níveis de radicais livres, como tabagismo, poluição, radiação, alimentação, medicamentos, pesticidas, solventes industriais dentre outros.

A maioria desses radicais livres são espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio, sendo instáveis e altamente reativas. Resultantes do processo metabólico aeróbico das células tornam-se prejudiciais quando seus níveis se encontram elevados, ocasionando a degradação de estruturas biológicas essenciais para o funcionamento metabólico celular e propiciando o desenvolvimento ou agravamento de doenças.

Existem muitos tipos de radicais livres nos sistemas vivos. É importante ressaltar que nem todo radical livre é uma espécie reativa de oxigênio e nem toda espécie reativa de oxigênio é um radical livre, porém ambos participam de importantes processos fisiopatológicos redox do organismo (VELLOSA et al., 2021). A maioria das moléculas biológicas não são radicais, entretanto, quando um radical livre reage com um não radical, resulta em um novo radical, gerando reações em cadeia (HALLIWELL, 2006).

Além das espécies reativas de oxigênio geradas durante a respiração celular, outras espécies reativas têm implicações consideráveis na biologia redox atuando no estresse oxidativo. Dentre elas, podemos destacar as espécies reativas de nitrogênio, geradas ao final do metabolismo de aminoácidos (SIES; BERNDT; JONES, 2017).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são geradas constantemente durante as catálises bioquímicas. As principais espécies geradas durante o metabolismo do oxigênio compreendem o radical superóxido ( $O_2^-$ ), formado após a primeira redução do oxigênio, o radical hidroperoxila ( $HO_2^-$ ) que representa o radical superóxido em sua forma protonada (ligada a uma molécula de  $H^+$ ), o radical hidroxila ( $OH^-$ ), formada na penúltima etapa da redução do oxigênio, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que apesar de não ser considerado um radical livre pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, pode reagir com outros compostos gerando radicais  $OH^-$ , e o oxigênio singlet ( $^1O_2$ ), que é a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Dentre as espécies reativas de nitrogênio inclui-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $N_2O_3$ )



ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (CAMPOS; LEME, 2018).

As lesões celulares ocasionadas pelas espécies reativas de oxigênio irão depender de sua toxicidade. O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por exemplo, é um metabólito da respiração celular com alta capacidade deletéria. São essenciais para o funcionamento fisiológico normal e sinalização (BARREIROS; DAVID, 2006; SCHORÖDER; EATON, 2008). De forma isolada não causa danos expressivos, porém é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares gerando radicais  $\text{OH}^-$ . É pouco reativo diante às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. Pelo fato da célula possuir metais de transição, ocorre a geração de radicais  $\text{OH}^-$ . O radical  $\text{OH}^-$  pode causar danos deletérios para o metabolismo celular, afetando o DNA, o ácido ribonucleico (RNA), as proteínas, os lipídios e as membranas celulares. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. No DNA, pode causar alterações nas bases nitrogenadas levando a inativação ou mutação deste.

Nas proteínas, a oxidação de grupos sulfidrilas e pontes dissulfeto pode ocasionar a inativação de proteínas, gerando danos como clivagens em ligações de aminoácidos. A alteração de aminoácidos em uma enzima pode fazer com que ela perca sua atividade enzimática ou assuma uma função diferente.

Nos lipídios, o exemplo mais comum da ação destes radicais, é na oxidação de ácidos graxos em membranas celulares, gerando a lipoperoxidação. A oxidação de lipídios na membrana pode afetar no transporte ativo e passivo, ocasionando a perda da seletividade da membrana e comprometendo a função celular (BARREIROS; DAVID, 2006).

Os mecanismos de lesão celular das espécies reativas de nitrogênio são semelhantes aos danos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio. Dentre as espécies reativas de nitrogênio, o NO é a espécie reativa mais importante, pois esse radical pode se difundir rapidamente entre e dentro das células formando compostos oxidativos que podem causar alterações na organização de macromoléculas importantes, como o DNA, proteínas, lipídios e enzimas. O NO pode ser produzido no organismo pela atividade da enzima NOS. Ao reagir com o radical  $\text{O}_2^-$ , gera  $\text{ONOO}^-$  que é um potente oxidante biológico, afetando as funções das mitocôndrias e desencadeando a morte celular por meio de reações de oxidação e nitração (VASCONCELOS et al., 2007). Como a formação de NO requer oxigênio, a taxa na qual ele será produzido é variável de acordo com a concentração intramitocondrial de oxigênio (TURRENS, 2003). A geração de  $\text{ONOO}^-$  diminui a biodisponibilidade do NO induzindo

vasoconstrição. A biodisponibilidade reduzida do NO está associada à hipertensão e aumento do estresse oxidativo (SENONER; DICHTL, 2019).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases). São proteínas ligadas à membrana que tem por função o transporte de elétrons através das membranas celulares, podendo gerar  $O_2^-$  em decorrência do acceptor de elétrons ser o oxigênio (BEDARD; KRAUSE, 2007). O aumento das espécies reativas de oxigênio está relacionado ao desenvolvimento de distúrbios vasculares pulmonares e sistêmicos (SHARMA et al., 2007).

O estresse oxidativo é um regulador importante na fibrose de muitos órgãos, como o fígado, pulmões, rins e na vasculatura. A proliferação de fibroblastos é modulada pelo  $O_2^-$  que contribui para a ativação de fibroblastos em miofibroblastos que por sua vez produzem grandes quantidades de matriz extracelular. As espécies reativas de oxigênio derivadas dessas enzimas estão envolvidas na deposição de matriz extracelular e remodelação vascular, sendo responsáveis pela fibrose em muitos órgãos, incluindo a vasculatura (CAVE et al., 2005).

Nos pulmões, os principais locais de produção de espécies reativas de oxigênio são nas células endoteliais, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos alveolares e células epiteliais alveolares. Na vasculatura pulmonar as espécies reativas de oxigênio podem ser produzidas na membrana celular, organelas celulares como os peroxissomos e mitôcondrias e no citoplasma.

Outra importante fonte de espécies reativas de oxigênio na vasculatura pulmonar é a enzima xantina oxidase (XO). A XO é uma flavoproteína que contém molibdênio e ferro. Inicialmente a XO existe na forma de xantina desidrogenase (XDH) (AGGARWAL et al., 2013). Alterações na homeostase celular como, por exemplo, um maior influxo de  $Ca^{2+}$  para as células pode ativar a conversão da XDH em XO por proteólise irreversível. A hipoxantina é o primeiro substrato para a oxidação pela XO. Quando o segundo substrato, o oxigênio, é atribuído na reação, formam-se as espécies reativas do metabolismo do oxigênio (CAMPOS; YOSHIDA, 2004). Estudos sugerem que espécies reativas de oxigênio são agentes importantes na patogênese da HP. Fatores implicados na geração de  $O_2^-$  como a XO contribuem para o desenvolvimento desta doença (HARTNEY et al., 2011). O  $O_2^-$ , derivado da XO pode induzir disfunção vascular, prejudicando o relaxamento arterial pulmonar e dessa forma contribuindo para o remodelamento vascular na HP (AGGARWAL et al., 2013).

Com o objetivo de inibir, reduzir e/ou eliminar os radicais livres impedindo seus efeitos deletérios, o organismo humano conta com um sistema de defesa antioxidante para a manutenção da homeostasia oxidativa. Esse sistema pode ser dividido em antioxidantes enzimáticos (endógenos), representados pelas enzimas antioxidantes, e por antioxidantes não enzimáticos (endógenos) ou exógenos, compostos pelos antioxidantes oriundos da dieta.

O sistema antioxidante enzimático é formado, principalmente, pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione oxidase (GO), glutathione reductase (GR) e peroxirredoxinas (Prxs). O sistema antioxidante não enzimático (endógeno) é representado pela ceruloplasmina, ferritina, transferrina, melatonina, glutathione, lactoferrina, ácido úrico, bilirrubina e poliaminas. O mecanismo de ação desse sistema pode atuar de três formas: por ação preventiva, em que os antioxidantes atuam prevenindo as reações dos radicais livres com as substâncias biológicas; por mecanismos de reparação, interrompendo as reações de oxirredução; e através do reparo aos danos estruturais causados pelas espécies reativas (MENDES; PEREIRA; ANGELIS-PEREIRA, 2020).

Algumas biomoléculas resultantes ou participantes dos processos de produção ou neutralização de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, podem ser utilizadas na avaliação dos níveis antioxidantes e de estresse oxidativo nas células. Exemplos de algumas biomoléculas relevantes neste aspecto são as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a CAT (VELLOSA et al., 2021).

A catalase é uma das enzimas antioxidantes mais importantes cuja função é prevenir os danos oxidativos celulares ao catalisar a conversão do  $H_2O_2$  em oxigênio e água com alta eficiência (PRIETO et al., 2009). É encontrada principalmente nos peroxissomos e no citosol e desempenha um papel significativo no metabolismo do  $H_2O_2$  como um regulador chave (NANDI et al., 2019). É bastante eficaz em altos níveis de estresse oxidativo podendo degradar 40 milhões de moléculas de  $H_2O_2$  em 1 segundo (AGGARWAL et al., 2013). Sua deficiência ou mau funcionamento está relacionado ao surgimento de diversas doenças, como hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus dentre outras (NANDI et al., 2019).

O TBARS é um produto formado como resultado do processo de peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres. Quando ocorre uma elevada peroxidação lipídica, é possível observar altas quantidades de TBARS nos tecidos, indicando um elevado estresse oxidativo (CHAKRABORTY et al., 2009). A lipoperoxidação é uma sequência de eventos bioquímicos sobre os lipídios insaturados das membranas celulares ocasionando a destruição de sua

estrutura, falência dos mecanismos de troca (perda da seletividade), alterações no DNA e nos componentes da matriz extracelular e em situações mais extremas, levando à morte celular. A importância da mensuração dos produtos decorrentes da lipoperoxidação em tecidos biológicos está relacionada à citotoxicidade destes produtos, que podem causar alterações celulares associadas a diversas doenças (LIMA; ABDALLA, 2001). A análise do TBARS é amplamente utilizada para medir a oxidação lipídica e a atividade antioxidante em sistemas fisiológicos. Um antioxidante pode atuar em qualquer etapa do processo antes da formação de TBARS. Portanto, a medição do TBARS não dá nenhuma indicação do mecanismo de ação do antioxidante, porém é utilizado para verificar a oxidação lipídica na presença de um antioxidante (GHANI et al., 2017).

As espécies reativas de oxigênio em concentrações baixas ou moderadas podem ser benéficas para as células participando de diversos processos fisiológicos de sinalização e regulação celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Entretanto, há situações em que o equilíbrio entre a produção destas espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes pode ser afetado devido a uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, ou porque existe uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes das células é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (FERREIRA; ABREU, 2007).

## 1.6 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio neuroendócrino produzido principalmente pela glândula pineal (SUN; GUSDON; QU, 2016) a partir do aminoácido triptofano. Por ser uma substância lipofílica, não é armazenada nos pinealócitos, mas liberada de imediato para os capilares sanguíneos após a sua formação (SCHOMERUS; KORF, 2005). Pode ser encontrada em outros tecidos, como o fígado, baço, estômago, intestinos, timo, córtex cerebral, cristalino, pele, etc. (JIN et al., 2014).

A melatonina está presente em quase todos os organismos e sua via sintética difere entre as diferentes espécies. Uma das características mais significativas da melatonina é a regulação do ritmo circadiano nos vertebrados, com pico de secreção à noite e níveis baixos durante o dia. Alterações no ritmo circadiano da melatonina podem resultar em uma

cronodisrupção, estando associada a diversos distúrbios de saúde, como doenças neurodegenerativas, doenças cardíacas, hipertensão e câncer. Outra função importante da melatonina é atuar como antioxidante. A melatonina e seus metabólitos são capazes de neutralizar diversos derivados tóxicos do oxigênio, em um efeito conhecido como cascata de eliminação de radicais livres. No entanto, na presença de estresse oxidativo intenso, a degradação da melatonina pelos radicais livres pode ser muito mais rápida do que a sua produção. Distúrbios relacionados ao estresse oxidativo, como nas doenças cardiovasculares, os níveis de melatonina são mais baixos do que os de indivíduos saudáveis (TAN et al., 2015).

Devido a sua propriedade anfifílica, a melatonina pode atuar de forma não mediada por receptores, regulando diretamente os processos bioquímicos intracelulares na eliminação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BALATU et al., 2019). A melatonina pode neutralizar diretamente o radical  $\text{OH}^-$  altamente tóxico, pode interagir com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e também diminuir a peroxidação de lipídios (MAARMAN, 2017).

O aumento da atividade antioxidante pode ser potencializado por receptores específicos. Para a ação da melatonina, existem dois receptores de membrana específicos, denominados MT1 e MT2. Estes receptores pertencem à superfamília dos receptores ligados a proteína G, podendo ligar-se às proteínas Gi/Go ou Gq/G11. Esses receptores estão distribuídos por todo o organismo sendo encontrado em muitos órgãos e tecidos, incluindo o sistema cardiovascular (BALATU et al., 2019). O receptor nuclear com afinidade para a melatonina é um receptor órfão da família dos receptores de ácido retinóico do tipo (ROR) (XU et al., 2019).

Além das suas características antioxidantes, a melatonina possui propriedades anti-inflamatórias e vasodilatadoras exercendo diversos benefícios cardiovasculares. Em pacientes com HAP, os níveis de melatonina se encontram mais baixos se comparado com pacientes saudáveis. Níveis mais baixos de melatonina também estão correlacionados ao aumento de citocinas inflamatórias, característico na HAP, e com uma pior taxa de sobrevivência a longo prazo desses pacientes (MAARMAN; LECOUR, 2021). Também é observado que a melatonina possui um efeito anti-hipertensivo, tanto em humanos quanto em ratos, estando envolvida na regulação do sistema cardiovascular, influenciando no tônus do músculo liso e na pressão arterial. Estudos mostram que pessoas com hipertensão possuem níveis reduzidos de melatonina em comparação com aquelas que possuem pressão arterial normal. A

administração do hormônio em pacientes hipertensos reduziu a pressão arterial para a faixa normal (DAS et al., 2008).

O desenvolvimento da HP está associado à perda da influência vasodilatadora da melatonina. Pesquisas demonstraram a presença de receptores melatonérgicos nas grandes artérias indicando que a melatonina, em ratos, pode prevenir a HP inibindo a inflamação e a proliferação de células musculares lisas arteriais pulmonares e inibindo o estresse oxidativo (MACLEAN, 2020). O excesso de espécies reativas de oxigênio pode diminuir a biodisponibilidade de NO e, dessa forma, reduzir a vasodilatação. A melatonina ao ligar-se aos seus receptores, pode ativar vias que reduzem os níveis intracelulares de cálcio, elevando o GMPc e causando vasodilatação. Outro mecanismo que evidencia a capacidade da melatonina em melhorar a vasodilatação na HP compreende a elevação dos níveis plasmáticos de L-arginina, que é um substrato usado para produzir o NO. Diversos estudos apoiam o entendimento de que o tratamento antioxidante na HP e na insuficiência do VD pode ser eficaz.

A melatonina pode ter seus efeitos antioxidantes eliminando ROS diretamente ou estimulando indiretamente a síntese ou atividade de enzimas antioxidantes (MAARMAN, 2017). A terapia antioxidante em estudos experimentais tem demonstrado reduzir ou retardar os processos de remodelação vascular pulmonar, indicando que a fisiopatologia da HP está fortemente associada às espécies reativas de oxigênio. Por conta disso, pesquisadores investigam o benefício da melatonina contra doenças humanas e como uma estratégia terapêutica na HP (MAARMAN, 2017).

## 1.7 MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDO POR MONOCROTALINA

Para compreender melhor as características patobiológicas da HAP, modelos animais experimentais têm sido importantes para poder testar e desenvolver novas abordagens terapêuticas. A espécie mais utilizada para o estudo das alterações patológicas pulmonares desta doença, tem sido o rato (STENMARK, et al., 2009).

Um dos modelos mais utilizados pelos pesquisadores para estudo da HAP é o modelo induzido por monocrotalina (MCT). Em comparação com outros modelos, é de baixo custo e simplicidade técnica (GEWEHR et al., 2019; GOMEZ - ARROYO et al., 2012 ).

A MCT é o principal alcaloide pirrolizidínico encontrado nas plantas do gênero *Crotalaria*, representada na figura 5. Pertencem à família Leguminosae, com mais de seiscentas espécies. São abundantes em zonas tropicais e subtropicais como África, Brasil, México e Índia. No Brasil, são conhecidas pelos nomes de “xique-xique”, “guizo-de-cascavel” ou “chocalho-de-cascavel” por conta de suas vagens secas que quando tocadas, o som emitido se assemelha ao som da cauda de uma cascavel. É a principal toxina derivada de plantas que acometem humanos e animais (HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010).



John D. Byrd, Universidade Estadual do Mississippi, Bugwood.org

**Figura 5** – *Crotalaria spectabilis* (disponível em <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1391154>).

É conhecida por seu efeito hepatotóxico, provocando lesões hepáticas (COPPLE; GANEY; ROTH, 2003), mas também possui efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos e cardiotóxicos (HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010).

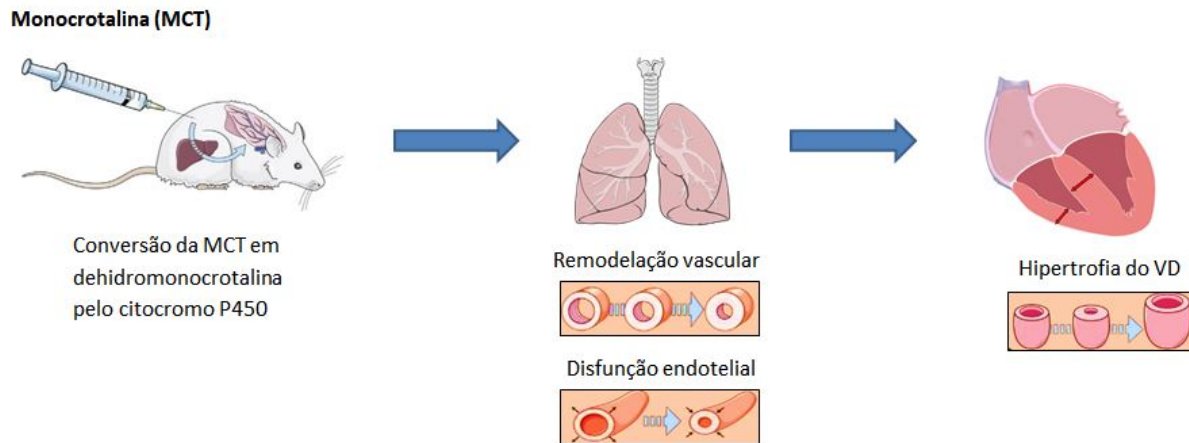
Em ratos, a HAP pode ser induzida pela administração de uma única injeção de monocrotalina (geralmente 60mg/Kg) aplicado por via intraperitoneal ou subcutânea, resultando em alterações patológicas no pulmão e no coração. Essas alterações são semelhantes às observadas em humanos com a doença, em termos de gravidade hemodinâmica e histopatológica e alta mortalidade (AGGARWAL et al., 2013; COSTE, et al., 2017).

A MCT induz lesões agudas na artéria pulmonar, caracterizada por danos no endotélio e nos pneumócitos tipo II, desenvolvimento de edema pulmonar e trombose *in situ*. Segue-se uma vasculopatia progressiva, evoluindo para uma HP progressiva e culminando com a morte dos animais em poucas semanas (HILL; GILESPIE; MCMURTRY, 2017). Poucas horas após a administração da injeção de MCT, seus efeitos já podem ser observados. Dentro de três a sete dias, os ratos podem apresentar sinais de apatia, anorexia, cianose, taquipneia e incapacidade de ganhar peso. Após uma semana, danos endoteliais vasculares pulmonares são percebidos, acompanhados de infiltrado inflamatório e edema, porém sem aumento da PAP. Duas semanas após a injeção de MCT, a PAP aumenta ocasionando uma hipertrofia do VD por volta da terceira semana. Em torno de 5-6 semanas, boa parte dos ratos tratados com MCT morrem de insuficiência cardíaca. Doses mais baixas de MCT (30mg/Kg) poderão resultar em uma HAP mais leve. É importante ressaltar que se aplicada topicamente ou injetada não causa toxicidade (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015 ).

Quando administrada em ratos, a MCT é metabolizada por diversas oxidases presentes no fígado, sendo bio ativada em dehidromonocrotalina pelo citocromo P450, o que leva à lesão vascular. Tem meia-vida curta e depois do fígado, o grande leito vascular que essa substância atinge é a circulação pulmonar onde seu efeito tóxico centraliza-se nos vasos pulmonares, sem grande relevância na circulação sistêmica (SANTOS - RIBEIRO et al., 2016; KASAHARA et al., 1997). São os metabólitos do alcalóide pirrolizidínico MCT que irão causar o desenvolvimento progressivo da HP em ratos (Figura 6) (TAYLOR et al., 1997).

Animais tratados com MCT apresentam interrupções importantes no tráfego da membrana intracelular, afetando diversas proteínas da membrana celular. A perda de proteínas de membrana resulta na ativação de fatores proliferativos, antiapoptóticos e no desequilíbrio da sinalização do NO. Esses fatores desencadeiam alterações vasculares pulmonares (GOMEZ - ARROYO et al., 2012). Os níveis aumentados de endotelina -1 e a diminuição de vasodilatadores mediados pelo NO, são evidências da disfunção endotelial (HILL; GILESPIE; MCMURTRY, 2017).





**Figura 6** – Modelo experimental de HAP induzida por MCT. Após a administração de MCT, ocorre a sua metabolização, sendo bio ativada em dehidromonocrotalina pelo citocromo P450. Os ratos sofrem remodelação vascular e disfunção endotelial o que leva a um aumento progressivo da RVP culminando com a hipertrofia do VD. HAP: hipertensão arterial pulmonar; MCT: monocrotalina; RVP: resistência vascular pulmonar; VD: ventrículo direito. Fonte: adaptado e modificado de SANTOS-RIBEIRO et al., 2016.

Entre diferentes linhagens de ratos, existem diferenças importantes no que diz respeito à sensibilidade a MCT. Diferenças no tempo de início e na extensão dos efeitos tóxicos podem variar de forma acentuada. Essas diferenças podem estar relacionadas à farmacocinética da MCT e as diferenças na degradação e formação hepática do pirrol tóxico da MCT ou na sua conjugação e excreção. Apesar destes fatos, este modelo é sem dúvida o que melhor contribui para o esclarecimento e entendimento do processo hipertensivo pulmonar. É um modelo artificial que imita muito bem os processos que ocorrem na disfunção das artérias pulmonares (CAMPIAN, et al., 2006; STENMARK, et al., 2009).

O modelo de HAP induzido por MCT é de grande relevância como modelo *in vivo* de testes de múltiplas vias metabólicas e de sinalização, auxiliando na identificação e elucidação dos mecanismos patobiológicos desta doença. (HILL; GILESPIE; MCMURTRY, 2017).

## **2 HIPÓTESE**

A administração da melatonina irá atuar como agente protetor para os pulmões e para o ventrículo direito dos ratos com HAP, melhorando parâmetros morfológicos e funcionais do VD e da artéria pulmonar e parâmetros de estresse oxidativo no pulmão.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da melatonina sobre os parâmetros morfológicos e funcionais do ventrículo direito e da artéria pulmonar e parâmetros de estresse oxidativo no pulmão de ratos com HAP.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reproduzir o modelo de HAP por MCT em ratos machos;
- Avaliar parâmetros ecocardiográficos de fluxo pela artéria pulmonar de ratos com HAP tratados ou não com melatonina;
- Avaliar parâmetros ecocardiográficos sistólicos e diastólicos do VD de ratos com HAP tratados ou não com melatonina;
- Analisar parâmetros morfométricos do VD, do pulmão e do fígado de ratos com HAP tratados ou não com melatonina;
- Analisar parâmetros de estresse oxidativo no pulmão de ratos com HAP tratados ou não com melatonina;
- Analisar a expressão da xantina oxidase no pulmão de ratos com HAP tratados ou não com melatonina

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para esse estudo foram utilizados ratos machos Wistar, com 45 dias de idade, com peso médio de  $200 \pm 50$  gramas. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Esses animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS e mantidos em grupos de 4 ou 3 ratos em cada caixa, sendo que as caixas apresentaram uma altura mínima de 17,8 cm, respeitando uma relação de área por animal de  $187 \text{ cm}^2$ , de acordo com a resolução normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Receberam água e alimentação (ração comercial) “*ad libitum*”. Foram mantidos sob períodos de 12 horas luz / 12 horas escuro e sob temperatura controlada ( $21 - 23^\circ$ ) e umidade relativa do ar de 70%.

### 4.2 CÁLCULO AMOSTRAL

O tamanho amostral foi calculado utilizando o programa G\* Power version 3.1.9. No cálculo do tamanho da amostra foram considerados probabilidade de erro  $\alpha = 0.05$  e poder do teste estatístico de  $(1 - \beta \text{ probabilidade de erro}) = 0.90$ . O tamanho da amostra que foi utilizada neste trabalho foi calculado também, a partir de estudos da literatura, os quais demonstram uma importante mortalidade no modelo experimental da Monocrotalina (GOMEZ - ARROYO et al., 2012). O n amostral calculado, foi de 10 animais por grupo (3 grupos experimentais), totalizando 30 animais ( $n= 30$ ).

### 4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo de acordo com a Resolução 57, de 6 de dezembro de 2022 e de acordo com a RN37/CONCEA (Diretriz da Prática de Eutanásia) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os experimentos com os ratos Wistar tiveram início após a aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, sob o número de homologação 40696.

### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em três grupos de forma aleatória: **Controle** (CTR); **Monocrotalina** (MCT); **Monocrotalina + Melatonina** (MCT + MEL). Os animais do grupo CTR receberam apenas água por gavagem por 20 dias e uma injeção intraperitoneal de solução salina no primeiro dia. Os animais do grupo MCT receberam uma única injeção intraperitoneal de monocrotalina (60mg/kg) (TÜRCK et al., 2020; ZIMMER et al., 2020) no primeiro dia do protocolo experimental e água por gavagem por 20 dias. Os animais do grupo MCT + MEL, receberam uma injeção intraperitoneal de monocrotalina no primeiro dia do protocolo experimental e melatonina por via gavagem na dose de 10 mg/kg por 20 dias (Figura 7) (MAARMAN et al., 2015).

Durante esse período, os animais foram pesados diariamente. Também foram observados quanto à ingestão alimentar ou qualquer outro sinal característico da instalação da doença como dispneia, cianose e/ou letargia. Animais que apresentassem alterações como dispneia, redução da locomoção, redução da ingestão hídrica e alimentar e sinais de infecção seriam eutanasiados. No presente projeto não foi necessária realizar esse procedimento de eutanásia, uma vez que os animais permaneceram bem durante todo o protocolo experimental.

### Protocolo Experimental de 21 dias:

#### Grupo Controle (CTR) - n = 10



1º dia - Solução Salina (0,9%)

20 dias - Água

#### Grupo Monocrotalina (MCT) - n= 10



1º dia - Monocrotalina (60 mg/kg)

20 dias - Água

#### Grupo Monocrotalina + Melatonina (MCT + MEL) - n= 10



1º dia - Monocrotalina (60 mg/kg)

20 dias - Melatonina (10 mg/kg/dia)

**Figura 7-** Representação dos grupos experimentais e protocolo experimental com duração de 21 dias. Fonte: elaborada pela autora.

## 4.5 ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS

No 21º primeiro dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos a avaliação ecocardiográfica da morfologia e da função do VD e da artéria pulmonar. Para esse procedimento, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Após a anestesia, os animais foram submetidos a tricotomia na região torácica. Para a obtenção das imagens cardíacas os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo (ZIMMER et al., 2020).

As imagens ecocardiográficas foram obtidas através de modo bidimensional (2D), modo-M e Doppler de ondas pulsadas (Philips HD7 Ultrasound System Andover, MA, USA), utilizando transdutor S12-4 (Philips, Andover, MA, USA).

Os seguintes parâmetros ecocardiográficos foram avaliados:

- frequência cardíaca (FC);
- débito sistólico;
- plano de excursão sistólica do anel da tricúspide (TAPSE);
- mudança na área fracional (FAC);
- velocidade de enchimento do VD (Pico E);
- sístole atrial (Pico A);
- tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar (TAC);
- tempo de ejeção (TEJ);
- relação entre o tempo de aceleração e tempo de ejeção do fluxo sanguíneo da artéria pulmonar (TAC/TEJ);
- diâmetro da artéria pulmonar na sístole.

#### 4.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

No 21º dia, os animais dos três grupos foram anestesiados para a realização da ecocardiografia e eutanásia. Os animais foram anestesiados com sobredose de quetamina (270 mg/kg) intraperitoneal e xilazina (30 mg/kg) intraperitoneal. Esta eutanásia foi certificada mediante decapitação em guilhotina manual conforme Lei 11915/2003 e as Diretrizes do CONCEA 05/2013 e as Diretrizes da Prática da Eutanásia CONCEA 2013. Esse procedimento ocorreu em um ambiente isolado e distante da sala de ecocardiografia, em ambiente apropriado e com materiais higienizados entre a morte de um animal e outro. Após a eutanásia foi realizada a retirada dos pulmões e do coração. As amostras de tecido pulmonar e cardíaco foram congeladas a -80°C para a realização das análises bioquímicas e moleculares.

## 4.7 DESCARTE DE RESÍDUOS

Para a realização de todos os procedimentos experimentais, foram utilizados equipamentos de proteção individual como jaleco, luva cirúrgica, máscara e óculos de proteção quando necessário. O descarte de resíduos, materiais tóxicos e contaminantes seguiram as regras estabelecidas pela UFRGS. Os resíduos biológicos (carcaças, tecidos) dos animais, foram acondicionados em sacos plásticos de coloração branca, congelados e encaminhados ao biotério setorial no ICBS – UFRGS, aos cuidados do CREAL. Os resíduos químicos foram separados, devidamente identificados e acondicionados para posterior envio ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) do Instituto de Química da UFRGS.

## 4.8 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Após as análises ecocardiográficas, os animais foram eutanasiados. Com o uso de materiais cirúrgicos, como tesouras e pinças, foi realizada uma toracotomia. O coração, os pulmões e o fígado foram rapidamente retirados e colocados em solução de KCl 1,15% sobre o gelo. Os átrios do coração foram extraídos e descartados. O VD foi dissecado do VE e septo. Foram pesados o VD e o VE. A hipertrofia do VD foi calculada através da razão entre o peso do VD e peso corporal (mg/cm) (ZIMMER et al., 2020). Os pulmões e o fígado também foram pesados e a razão do peso órgão/peso corporal foi avaliada como índice de congestão do órgão (ARAUJO et al., 2006). Ao longo do protocolo experimental, os animais foram pesados diariamente, para acompanhamento da evolução do seu peso corporal, sendo esse resultado expresso em gramas (g). A avaliação do peso corporal final foi obtida através da pesagem do animal antes de sua eutanásia.

## 4.9 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 4.9.1 Preparação tecidual e medição da concentração de proteínas



O tecido pulmonar foi homogeneizado em Ultra-Turrax usando fluoreto de fenil metilsulfonil 20 mmol/L e 1,15% p/v KCl. A suspensão foi submetida à centrifugação a 1000 g por 10 min a 0 – 4°C para remoção dos restos celulares e núcleos. As análises bioquímicas foram realizadas utilizando-se os sobrenadantes (LLESUY et al., 1985). Os níveis de proteína foram medidos pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), e a albumina de soro bovino foi usada como padrão.

#### 4.9.2 Avaliação de nitritos

Os nitritos ( $\text{NO}^{2-}$ ) foram determinados usando o reagente Griess, no qual um cromóforo com forte absorbância a 540 nm é formado pela reação do nitrito com uma mistura de Naftil-1-N-Etilenodiamina (0,1 %) e sulfanilamida (1%). Os resultados foram expressos em mmol/L por miligrama de proteína (GRANGER et al., 1999).

#### 4.9.3 Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A geração de ROS foi medida por emissão de fluorescência de 20,70 diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA). Na presença de ROS intracelulares, a DCFH-DA, que é permeável à membrana, rapidamente é oxidada em 2,7-diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente. As amostras foram excitadas a 488 nm. Essa emissão foi coletada com um filtro de passagem longa com 525 nm de comprimento, sendo expressa em nmols por miligrama de proteína (LEBEL et al., 1992).

#### 4.9.4 Determinação de grupos sulfidrilas totais

A quantidade total de grupos sulfidrilas (-SH) nos homogeneizados de pulmão foi determinada de acordo com Sedlak e Lindsay. Foi lida a densidade óptica a 412 nm em espectrofotômetro em comparação com controle branco apropriado. A concentração de grupos sulfidrilas total foi expressa em pmol/mg proteína (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

#### 4.9.5 Método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para o ensaio de TBARS, foi adicionado ácido tricloroacético (10% p/v) ao homogeneizado para precipitar proteínas e acidificar amostras. Essa mistura foi então centrifugada (1.000 g, por 3 min). A amostra livre de proteínas foi extraída e o ácido tiobarbitúrico (0,67% p/v) foi adicionado ao meio. Os tubos foram colocados em banho-maria (100 °C) por 15 min. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 535 nm. Como padrão foi utilizado malondialdeído comercial. Os resultados foram expressos em micromole por miligrama de proteína ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteína) (BUEGE ; AUST, 1978).

#### 4.9.6 Western blot

Após homogeneização do pulmão e eletroforese de proteínas, as amostras (100  $\mu\text{g}$  de proteína) foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio em sistema descontínuo, utilizando géis de separação e empilhamento de 8–14% (p/v) (LAEMMLI, 1970). Para a detecção foi utilizado o seguinte anticorpo: xantina oxidase (150 kDa) (Santa Cruz, Santa Cruz Biotecnologia, MA). Anticorpo primário foi detectado usando o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com horseradish peroxidase. Reagentes de detecção por quimioluminescência foram usados para desenvolver as membranas, e as autorradiografias geradas foram medidas quantitativamente com um densitômetro de imagem (Image J, National Institutes of Health, EUA). Para determinar os pesos moleculares das bandas, foi utilizado como referência um marcador de peso molecular padrão (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, EUA). Os dados foram normalizados pelo método de Ponceau S (KLEIN et al., 1995).

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

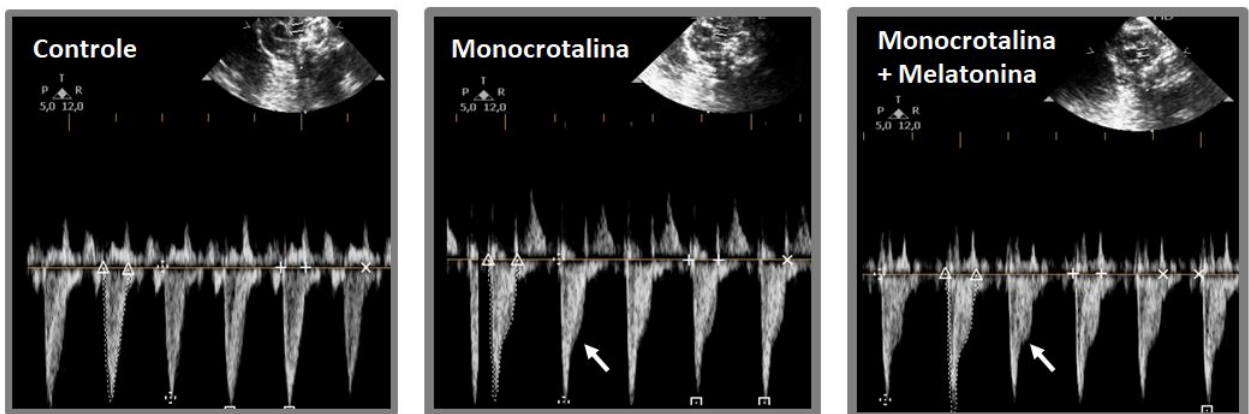
Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e analisados pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls. Os dados não paramétricos foram expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Significância estatística foi considerada quando  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Sigma Plot 12.0. Todos os gráficos foram criados com o software GraphPad Prism (versão 5.0).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 DADOS ECOCARDIOGRÁFICOS

#### 6.1.1 Fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar

Uma das características da HAP é o aumento da resistência na vasculatura pulmonar, por conta da obliteração dos seus vasos sanguíneos. Vasos obstruídos limitam o fluxo sanguíneo através das artérias pulmonares. A figura 8 corresponde a uma imagem representativa do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar nos grupos CTR, MCT e MCT+MEL por ecocardiografia Doppler. A seta em branco demonstra a resistência ao fluxo sanguíneo na artéria pulmonar presente nos grupos que receberam monocrotalina. Os animais do grupo CTR não apresentaram resistência ao fluxo sanguíneo na artéria pulmonar. Nos animais dos grupos MCT e MCT+MEL, observou-se uma resistência aumentada ao fluxo sanguíneo na artéria pulmonar.



**Figura 8** - Medidas do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar de rato Wistar. Imagem representativa do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar nos grupos Controle, Monocrotalina e Monocrotalina + Melatonina por ecocardiografia Doppler. A seta em branco indica a resistência ao fluxo sanguíneo na artéria pulmonar presente nos grupos que receberam Monocrotalina.

Os parâmetros ecocardiográficos analisados na artéria pulmonar para os grupos CTR, MCT e MCT + MEL, estão apresentados na tabela 2. O tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar (TAC) se encontra diminuído nos grupos MCT e MCT + MEL em relação ao grupo CTR. Por conta da resistência aumentada na artéria pulmonar o fluxo sanguíneo se encontra com a aceleração reduzida. O tempo de ejeção (TEJ) do sangue para a artéria pulmonar, não demonstrou uma diferença estatística considerável entre os grupos CTR, MCT e MCT + MEL. Porém, percebeu-se um tempo de ejeção um pouco maior nos animais do grupo MCT, provavelmente por conta da resistência aumentada na artéria pulmonar, embora não haja diferença estatística entre os grupos em relação a esse parâmetro. A razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (TAC/TEJ) se mostrou diminuída nos grupos MCT e MCT + MEL quando comparados com o grupo CTR, indicando um aumento na resistência da artéria pulmonar. No diâmetro arterial na sístole não se observou alteração significativa entre os grupos CTR, MCT e MCT + MEL. Embora não tenha apresentado diferença significativa, foi observado que no grupo MCT houve uma redução no diâmetro arterial na sístole.

**Tabela 2. Parâmetros ecocardiográficos analisados na artéria pulmonar.**

Parâmetros Ecocardiográficos	Controle	Monocrotalina	MCT + Melatonina
	(n=10)	(n=10)	(n=10)
<b>Artéria Pulmonar</b>			
<b>Tempo de Aceleração (TAC) (s)</b>	0,034 (0,03; 0,034)	0,020 (0,01; 0,024) a	0,020 (0,01; 0,025) a
<b>Tempo de Ejeção (TEJ) (s)</b>	0,098 (0,094; 0,106)	0,108 (0,098; 0,116)	0,101 (0,096; 0,126)
<b>TAC/TEJ</b>	0,321 (0,31; 0,362)	0,188 (0,15; 0,226) a	0,201 (0,15; 0,265) a
<b>Diâmetro arterial na sístole (cm)</b>	0,272 (0,243; 0,298)	0,253 (0,234; 0,261)	0,270 (0,251; 0,283)

Os dados estão apresentados como mediana (percentil 25%, percentil 75%).

<sup>a</sup> Diferença estatística em relação ao grupo controle ( $P < 0.05$ ).

### 6.1.2 Parâmetros ecocardiográficos do VD

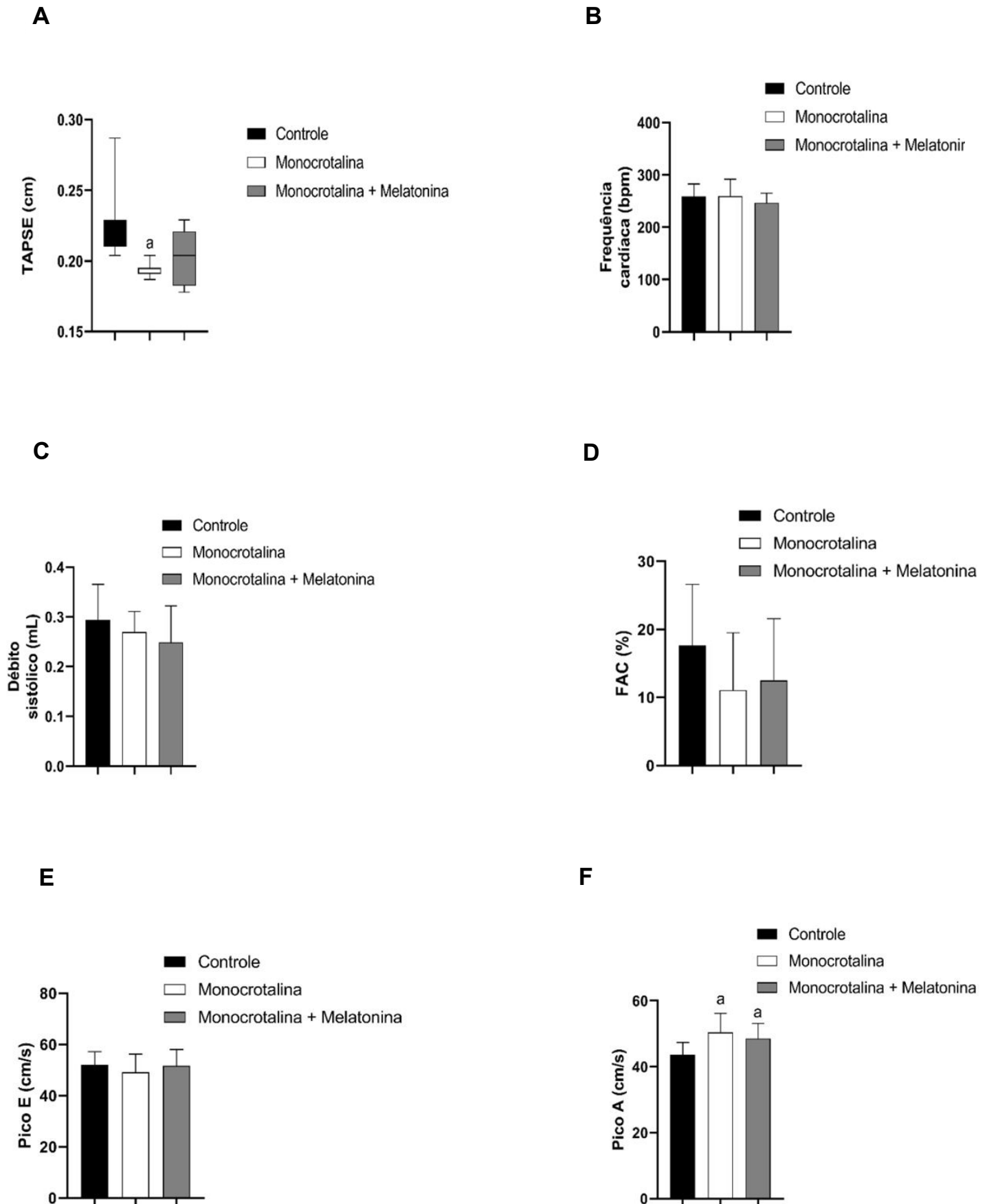
O modelo animal de HAP induzido por MCT é caracterizado por apresentar alterações estruturais e funcionais no VD. O remodelamento dos vasos arteriais pulmonares leva a um aumento na resistência vascular pulmonar e diminuição do fluxo sanguíneo através destes vasos, aumentando a pós-carga do VD. Dessa forma, durante o exame ecocardiográfico, também foram avaliados parâmetros sistólicos do VD, como: plano de excursão sistólica do anel da tricúspide (TAPSE), débito cardíaco (DC) e mudança na área fracional (FAC). Parâmetros diastólicos do VD também foram avaliados, incluindo a velocidade de enchimento do ventrículo direito (Pico E) e sístole atrial (Pico A). A frequência cardíaca (FC) também foi avaliada. Esses dados estão representados na Figura 9.

O TAPSE representa uma medida da função de encurtamento longitudinal do VD. Na figura 9A, o grupo MCT apresentou redução do TAPSE em comparação ao grupo CTR e MCT + MEL. O TAPSE reduzido no grupo MCT se deve ao fato de que a HAP causou uma diminuição na contratilidade do VD. No grupo MCT + MEL não houve diferença estatística em relação ao grupo CTR. Para este parâmetro, a melatonina preveniu uma piora da contratilidade do VD.

Na figura 9B, a FC não apresentou alteração significativa em nenhum dos grupos. O mesmo ocorreu com o débito sistólico, indicado na figura 9C, onde em nenhum dos grupos foi observado diferença significativa.

Outro parâmetro de contratilidade verificado foi a FAC, indicado na figura 9D. A FAC (%) estima a função global sistólica do VD, que não se mostrou diferente entre os grupos experimentais.

O Pico E, figura 9E, corresponde a velocidade de enchimento do VD. Em nenhum dos grupos houve diferença significativa no Pico E. A figura 9F indica a sístole atrial. Nos grupos afetados pela HAP, que são os grupos MCT e MCT + MEL, a onda representativa da sístole do átrio direito (AD) está aumentada em comparação com o grupo CTR. Nesse parâmetro foi evidenciada uma alteração na capacidade sistólica dessa câmara cardíaca nos animais dos grupos MCT e MCT + MEL, sugerindo que o AD dos animais doentes pudesse estar hipertrofiado. Para esse parâmetro a melatonina não atenuou as alterações provocadas pela HAP no AD desses animais.



**Figura 9** – Análises ecocardiográficas do ventrículo direito. A- TAPSE (cm): plano de excursão sistólica do anel da tricúspide. B- frequência cardíaca (bpm). C- débito sistólico (mL). D- FAC (%): mudança na área fracional. E- Pico E (cm/s): velocidade de enchimento do ventrículo direito. F- Pico A (cm/s): sístole atrial. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana (percentil 25%, percentil 75%). <sup>a</sup> Diferença estatística em relação ao grupo controle ( $P < 0.05$ ).

## 6.2 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

A figura 10 mostra as análises morfométricas realizadas nos três grupos experimentais. Os dados morfométricos analisados foram: peso final dos animais, peso do VD/peso corporal, peso do pulmão, peso do pulmão/peso corporal, peso do fígado e peso do fígado/peso corporal.

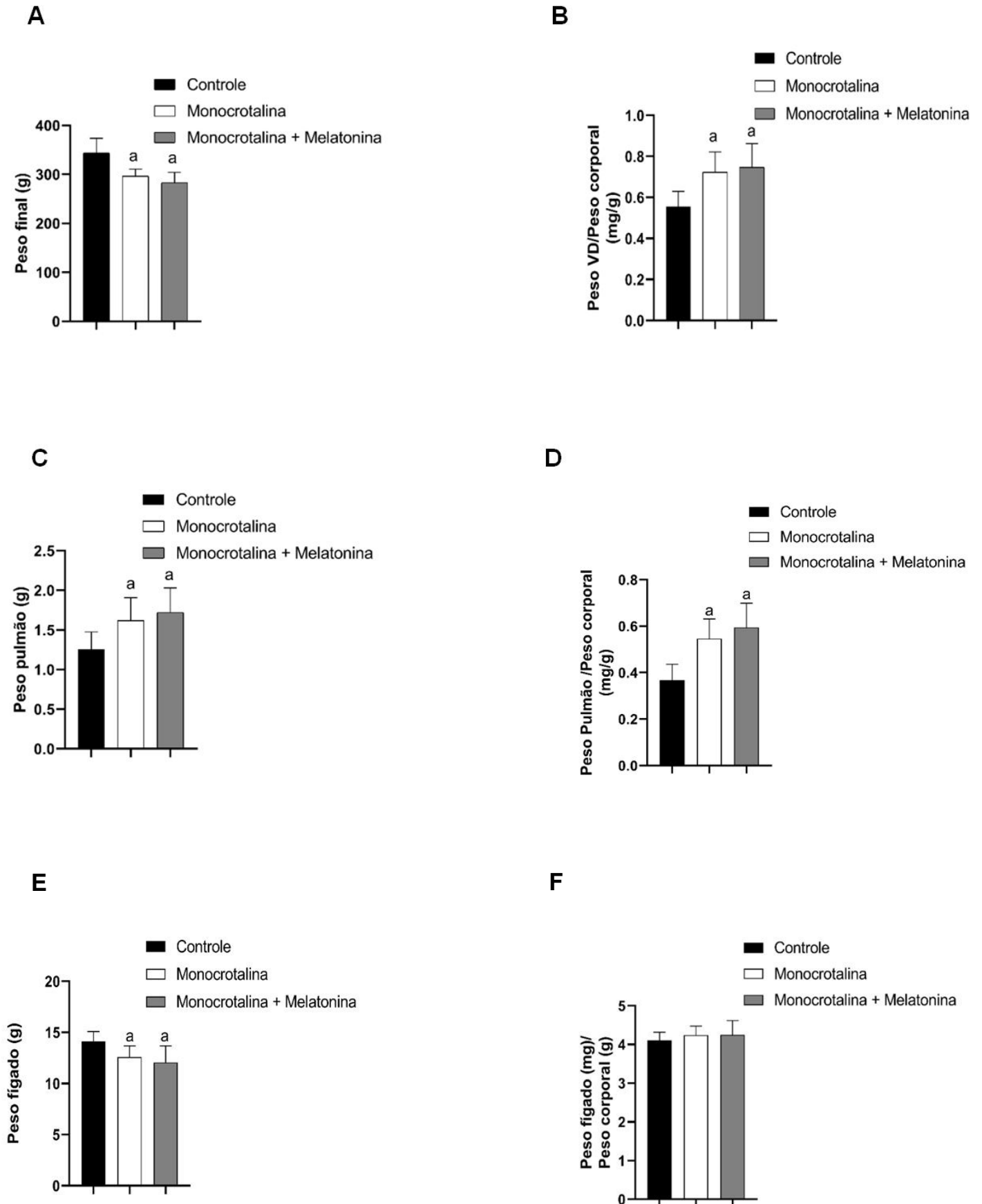
Como apresentado na figura 10A, os grupos MCT e MCT + MEL tiveram menos ganho de peso em comparação ao grupo CTR, indicando uma influência da doença sobre o ganho de peso nesses animais.

A hipertrofia ventricular direita foi avaliada pelo peso do VD/peso corporal, como apresentado na figura 10B. Os grupos MCT e MCT + MEL apresentaram hipertrofia do VD em relação ao grupo CTR. A hipertrofia do VD é uma alteração característica da HAP em resposta ao aumento da resistência na artéria pulmonar. Em relação a esse parâmetro, a administração de melatonina não foi capaz de prevenir o processo hipertrófico.

A figura 10C mostra que o peso do pulmão dos animais dos grupos MCT e MCT + MEL se encontra aumentado quando comparado com o grupo CTR. A melatonina não foi capaz de prevenir esse aumento. A congestão do pulmão foi avaliada pelo peso do pulmão/peso corporal, como evidenciado na figura 10D. Os grupos MCT e MCT + MEL apresentaram congestão pulmonar em relação ao grupo CTR. Sabe-se que na HAP, a hiperplasia e proliferação de células nas diferentes camadas do endotélio vascular somado a presença de infiltrado inflamatório, podem contribuir para o aumento de peso e congestão do pulmão. (GOMEZ - ARROYO et al., 2012 ).

Em relação ao fígado, como mostra a figura 10E os animais dos grupos MCT e MCT + MEL tiveram uma diminuição do peso em comparação ao grupo CTR. O parâmetro de congestão do fígado é mostrado na figura 10F, onde a relação do peso do fígado/peso corporal não apresentou diferença significativa entre os grupos. Uma das características da MCT quando administrada em modelos animais, é a sua hepatotoxicidade. Uma explicação para a diminuição do peso do fígado seria um possível efeito tóxico da monocrotalina sobre os hepatócitos, levando a diminuição do número dessas células e diminuição do peso do órgão (GOMEZ - ARROYO et al., 2012 ).





**Figura 10** – Análises morfométricas. A- peso final dos animais (g). B- Peso ventrículo direito/peso corporal (mg/g). C- peso pulmão (g). D- peso pulmão/peso corporal (mg/g). E- peso fígado (g). F- peso fígado/peso corporal (mg/g). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença estatística em relação ao grupo controle ( $P < 0.05$ ).

### 6.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A figura 11 apresenta o dano oxidativo no tecido pulmonar, avaliado pelos seguintes parâmetros: concentração total de espécies reativas de oxigênio (ROS), níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), quantificação de grupos sulfidril (-SH), atividade da enzima catalase (CAT), concentração de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) totais e expressão da enzima xantina oxidase (XO).

A figura 11A mostra que nos grupos MCT e MCT + MEL, houve uma redução ao conteúdo de ROS estatisticamente significativa em relação ao grupo CTR. Sabe-se que HAP desencadeia processos inflamatórios e oxidativo no tecido pulmonar. Por esta razão, esperava-se que houvesse uma concentração maior de ROS nos grupos que receberam monocrotalina. Uma hipótese para essa redução de ROS pode estar no momento em que foi realizada a análise do tecido pulmonar. Como o tempo de duração do protocolo experimental foi de 21 dias, ao longo deste processo pode ter acontecido uma resposta antioxidante bastante expressiva no combate as ROS. Ao analisar o tecido pulmonar ao final deste período, as ROS se encontravam bastante reduzidas em relação ao grupo CTR.

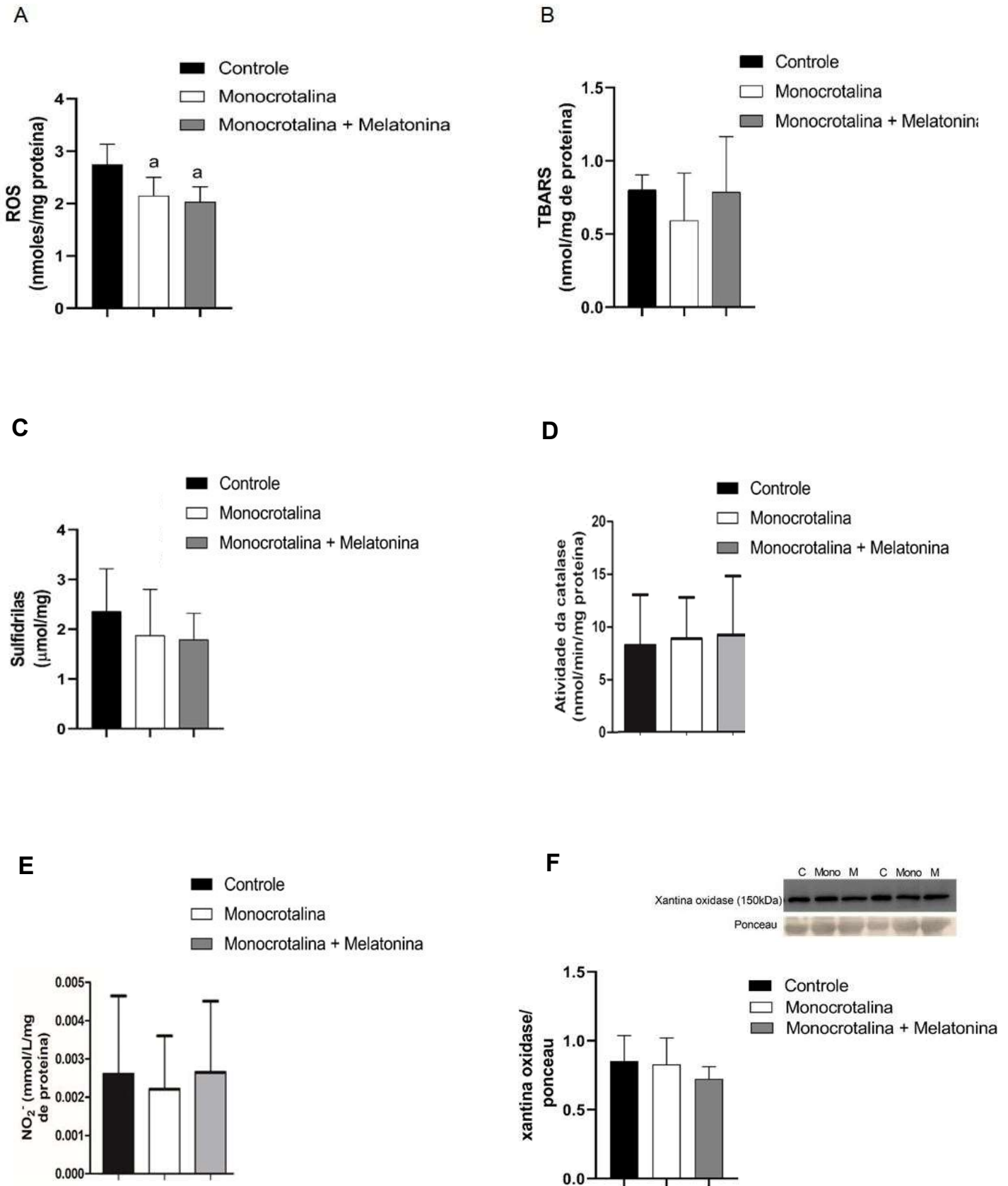
O TBARS é um método empregado na avaliação do dano oxidativo em modelos experimentais de diversas doenças. Avaliando a peroxidação lipídica analisada por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), não houve alterações significativas entre os grupos, como mostra a figura 11B.

O conteúdo de sulfidrilas, apresentado na figura 11C, representa uma defesa antioxidante não enzimática ao dano oxidativo de proteínas. Entre os grupos comparados, CTR, MCT e MCT + MEL não houve mudanças significativas. Embora não tenha apresentado diferença relevante estatisticamente, foi observado que nos grupos que receberam MCT, houve uma redução no teor de sulfidrilas.

Outra importante linha de defesa antioxidante analisada neste estudo foi a atividade da enzima CAT, evidenciado na figura 11D. Entre os grupos experimentais, não foi observada diferença estatisticamente significativa. Alguns estudos mostram que em pacientes com HP, as atividades séricas da CAT podem não ser muito diferentes dos grupos Controle (AGGARWAL et al., 2013).

A concentração de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), um dos metabólitos do NO, está apresentada na figura 11E. Nessa análise, não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos.

A XO é outra fonte importante de ROS na vasculatura pulmonar. Em relação à expressão dessa enzima, não houve diferença entre os grupos experimentais, como mostra a figura 11F.



**Figura 11** – Análises bioquímicas do tecido pulmonar. A- ROS: concentração total de espécies reativas de oxigênio (nmoles/mgproteína). B- TBARS: níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmoles/mgproteína). C- quantificação de grupos sulfidriila ( $\mu\text{mol/mg}$  proteína). D- atividade da enzima catalase (nmol/min/mgproteína). E- concentração de nitritos totais (nmol/L/mgproteína). F- expressão da enzima xantina oxidase/ponceau. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Diferença estatística em relação ao grupo controle ( $P < 0.05$ ). ROS: espécies reativas de oxigênio; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

## 7 DISCUSSÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é um tipo de hipertensão pulmonar (HP) que afeta principalmente a vasculatura pulmonar (THENAPPAN et al., 2018). É uma patologia com diferentes etiologias e patogênese, para a qual não há cura. A HAP é caracterizada por remodelação vascular excessiva, obstrução arterial pulmonar e resistência vascular pulmonar elevada, resultando em uma sobrecarga do ventrículo direito (VD) e levando a uma insuficiência cardíaca e morte (SANTOS - RIBEIRO et al., 2016). Um dos principais estímulos para o processo de remodelação vascular são os danos oxidativos mediados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e os processos inflamatórios. Embora sejam desconhecidos os mecanismos exatos que prejudicam a função e a estrutura vascular pulmonar, as lesões oxidativas desempenham um papel importante nesse processo (AGGARWAL et al., 2013).

Com o intuito de compreender melhor o mecanismo fisiopatológico e o processo de remodelação vascular, pesquisadores tem se utilizado de modelos animais experimentais de HAP. Modelos experimentais apropriados são importantes para desenvolver e testar novas abordagens terapêuticas (HILL; GILESPIE; MCMURTRY, 2017). Um dos modelos experimentais que mais tem contribuído para a compreensão da fisiopatologia da HAP e desenvolvimento terapêutico é o modelo da monocrotalina (MCT) (GEWEHR et al., 2019; GOMEZ - ARROYO et al., 2012 ).

A MCT é conhecida por seus efeitos hepatotóxicos, pneumotóxicos e cardiotoxicos. É um modelo frequentemente utilizado pelos pesquisadores para investigação da HAP, pois oferece simplicidade técnica, fácil reprodutibilidade e baixo custo se comparado com outros modelos (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015 ). O modelo MCT é capaz de mimetizar vários aspectos relevantes da HAP humana, incluindo remodelamento vascular, aumento de citocinas inflamatórias e falência do VD (GEWEHR et al., 2019), sendo a vasoconstrição pulmonar um componente importante deste modelo (GOMEZ - ARROYO et al., 2012 ).

Conhecida por sua ação antioxidante e anti-inflamatória, estudos sugerem que a melatonina, por exemplo, pode desempenhar um papel importante na HP e em doenças cardiovasculares (SUN; GUSDON; QU, 2016). Pesquisas demonstraram que a melatonina foi capaz de inibir a progressão da HAP e melhorar a disfunção ventricular direita, reduzindo a

inflamação, o edema pulmonar, o dano estrutural pulmonar, a fibrose intersticial, o estresse oxidativo, o remodelamento vascular e a vasoconstrição (MAARMAN; LECOUR, 2021).

Baseado nas informações encontradas na literatura, este trabalho tem como objetivo analisar os efeitos da melatonina na HAP e seus efeitos sobre parâmetros funcionais do VD e da artéria pulmonar e sobre o estresse oxidativo no pulmão de ratos. Para esse estudo foram utilizados 30 ratos machos Wistar divididos em três grupos, sendo um controle (CTR), um submetido à indução de HAP por monocrotalina (MCT) e outro submetido à indução de HAP por monocrotalina e tratado com melatonina (MCT+MEL).

A HAP foi induzida nestes animais através da administração de MCT em uma única injeção intraperitoneal de monocrotalina (60mg/kg). Em ratos, isso resulta em alterações patológicas no pulmão e no coração semelhante às observadas em humanos com HP (AGGARWAL et al., 2013; GEWEHR et al., 2019; GOMEZ - ARROYO et al., 2012 ). Com o passar das semanas, o aparecimento gradativo dos sinais da doença nos animais que recebem a MCT são bastante evidentes. Os ratos tratados com a MCT apresentam uma mortalidade significativamente maior (GOMEZ - ARROYO et al., 2012; HILL; GILESPIE; MCMURTRY, 2017) e por volta da terceira semana após a administração desta substância, metade dos ratos injetados morrem (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015 ). Por estas razões, optou-se por realizar um protocolo experimental de três semanas (21 dias). Estabelecemos iniciar o tratamento com a melatonina a partir do primeiro dia de protocolo, tendo em vista o papel antioxidante e anti – inflamatório deste hormônio que poderia prevenir e/ou reduzir aspectos importantes da fisiopatologia da HAP. A melatonina foi administrada diariamente na dose de 10mg/kg a partir do 2º dia de protocolo (MAARMAN et al., 2015).

Uma das características da HAP é o aumento da resistência na vasculatura pulmonar, por conta da obliteração dos seus vasos sanguíneos. Os vasos obstruídos limitam o fluxo sanguíneo através das artérias pulmonares (AGGARWAL et al., 2013; TUDER et al., 2007). Após 2-3 semanas da administração de MCT, o estado dos animais começa a piorar como resultado do espessamento progressivo da vasculatura pulmonar e essas anormalidades levam a um aumento progressivo da pressão arterial pulmonar média (PAPm) e da resistência vascular pulmonar, levando a hipertrofia do VD (SANTOS-RIBEIRO et al., 2016; NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015). Embora a realização do cateterismo cardíaco direito seja necessário para confirmar o diagnóstico de HP, a triagem inicial é realizada com o exame de ecocardiografia. A análise ecocardiográfica é o melhor exame não invasivo para avaliação

da HP (CALDERARO et al., 2019; MARTINS JUNIOR, 2014; SAHAY, 2019; YOO, 2023), da estrutura e da função do VD. Possui um papel importante na detecção dos estágios pré-clínicos da doença bem como na avaliação de resultados, monitorando a eficácia de intervenções terapêuticas específicas para HP (LAI et al, 2014; BOSSONE et al, 2013).

Ao final do protocolo experimental (21º dia) os animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica, da artéria pulmonar, da morfologia e da função do VD. Através deste exame foi possível estimar alguns parâmetros da artéria pulmonar, como o tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar (TAC), o tempo de ejeção do sangue para a artéria pulmonar (TEJ), a razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (TAC/TEJ) do fluxo sanguíneo para a artéria pulmonar e o diâmetro arterial na sístole. A ecocardiografia também pode ser usada para estimar a resistência vascular pulmonar através da velocidade do jato regurgitante da valva tricúspide e o tempo de aceleração da ejeção do sangue do VD na artéria pulmonar (LAI et al, 2014). A avaliação da resistência vascular pulmonar é bastante útil na definição da HAP.

Nossos dados ecocardiográficos mostram que nos animais dos grupos MCT e MCT + MEL, foi observado esse aumento da resistência ao fluxo sanguíneo na artéria pulmonar evidenciando a eficácia no desenvolvimento da HAP. Os animais do grupo CTR não apresentaram resistência ao fluxo sanguíneo na artéria pulmonar, confirmando que o modelo experimental de HAP induzida pela MCT, foi executado. Esse aumento na resistência pode ser evidenciado na figura 8 presente nesta dissertação, a qual demonstra uma alteração no padrão de onda representativa do fluxo pela artéria pulmonar nos animais dos grupos hipertensos.

Outro parâmetro que pode ser utilizado na determinação de HAP baseia-se na medida do tempo de aceleração (TAC) da velocidade de fluxo da via de saída do VD, definido como o tempo de intervalo entre o início do fluxo anterógrado na artéria pulmonar até o pico do fluxo, sendo esse valor inversamente proporcional às pressões pulmonares (BUENO; BERNARDO; SALGADO, 2015). O TAC é medido como pico de velocidade da regurgitação pela tricúspide. Em resposta a um aumento de pressão na artéria pulmonar, a valva pulmonar tende a se fechar prematuramente, fazendo com que o pico de velocidade seja alcançado mais cedo durante a sístole nos animais que receberam monocrotalina. Quanto mais curto o tempo de aceleração maior a resistência vascular pulmonar e maior a pressão na artéria pulmonar (RUDSKI et al., 2014). Por conta da resistência aumentada na artéria pulmonar, houve uma

redução da aceleração do fluxo sanguíneo neste vaso. O tempo de aceleração do fluxo sanguíneo pela artéria pulmonar (TAC) se mostrou diminuído nos grupos MCT e MCT + MEL em relação ao grupo CTR. Quando presente, a resistência pulmonar é caracterizada por uma ascensão rápida da velocidade do fluxo após o fechamento da valva pulmonar e uma desaceleração gradual até a próxima abertura (BUENO; BERNARDO; SALGADO, 2015). Em relação a esse parâmetro, a administração de melatonina não foi capaz de prevenir essa alteração.

O aumento de pressão na artéria pulmonar também leva a um prolongado período de ejeção nesses animais. O tempo de ejeção (TEJ) do sangue para a artéria pulmonar, não demonstrou uma diferença estatística considerável entre os grupos. Porém, percebeu-se um tempo de ejeção um pouco maior nos animais do grupo MCT, provavelmente por conta da resistência aumentada na artéria pulmonar, embora não haja diferença estatística entre os grupos em relação a esse parâmetro.

Outro importante parâmetro analisado foi a razão TAC/TEJ, que corresponde a uma medida ecocardiográfica que representa a razão entre o tempo de aceleração pelo tempo de ejeção na artéria pulmonar e é relacionada indireta e inversamente com a resistência vascular pulmonar. Para este parâmetro foi observada uma redução na razão entre o tempo de aceleração e o tempo de ejeção (TAC/TEJ) mensurada na artéria pulmonar nos grupos MCT e MCT + MEL quando comparados com o grupo CTR, indicando um aumento na resistência da artéria pulmonar. Essa redução TAC/TEJ nos grupos que receberam a monocrotalina também foi encontrada em outros trabalhos (ZIMMER et al., 2020; TÜRCK et al., 2020). A administração de melatonina também não foi capaz de reverter a alteração nesse parâmetro.

Em relação ao diâmetro arterial na sístole não se observou alteração significativa entre os grupos CTR, MCT e MCT + MEL. Embora não tenha apresentado diferença significativa, foi observado que no grupo MCT houve uma redução no diâmetro arterial na sístole. Dessa maneira, a partir dos nossos achados ecocardiográficos, notamos que o aumento da resistência pulmonar induzida pelas alterações no leito pulmonar gerada pela progressão da doença induzida pela monocrotalina, não foi revertida pelo tratamento com a melatonina.

O modelo animal de HAP induzido por monocrotalina também é caracterizado por apresentar alterações estruturais e funcionais no VD. A administração da monocrotalina em ratos causa lesões pulmonares progressivas caracterizadas por remodelação vascular



pulmonar, HP e hipertrofia compensatória do VD (SCHULTZE; ROTH, 1998). O aumento da resistência vascular pulmonar por conta do remodelamento dos vasos arteriais pulmonares e a diminuição do fluxo sanguíneo através destes vasos aumentam a pós-carga do VD (NOGUEIRA-FERREIRA et al., 2015 ). Embora a remodelação vascular pulmonar seja o principal processo patológico na HAP, a insuficiência cardíaca direita é a principal causa de morte (LAU et al., 2017; RYAN et al., 2015). No contexto da HAP, a avaliação do VD é fundamental na determinação da gravidade e do prognóstico da doença.

Para avaliar a função e a estrutura do VD, durante o exame ecocardiográfico, foram avaliados parâmetros sistólicos do VD, como: plano de excursão sistólica do anel da tricúspide (TAPSE), débito cardíaco (DC) e mudança na área fracional (FAC). Parâmetros diastólicos do VD também foram avaliados, incluindo a velocidade de enchimento do ventrículo direito (Pico E) e sístole atrial (Pico A). A frequência cardíaca (FC) também foi avaliada.

A análise da função sistólica do VD fornece uma avaliação qualitativa da função sistólica desta câmara. O VD apresenta fibras superficiais responsáveis pelo seu movimento centrípeto, bem como fibras longitudinais internas, responsáveis pela contração da base ao ápice. Esse encurtamento da base ao ápice tem um papel importante no esvaziamento do VD (RUDSKI et al., 2014 ). O VD normal está relacionado a pressões pulmonares baixas. À medida que o VD sofre hipertrofia para tentar se sobrepor ao aumento de resistência pulmonar, o tamanho do VD pode diminuir e sua espessura aumentar, acompanhando o aumento da resistência vascular pulmonar. O movimento do VD é restrito principalmente ao encurtamento longitudinal (da base ao ápice) e ao espessamento sistólico (KONSTAM et al., 2018). O VD sofre encurtamento sistólico devido a uma camada profunda de fibras e esse encurtamento diminui quando a função do VD está prejudicada. Este padrão contrátil predominantemente longitudinal do VD pode ser explorado para avaliar a sua função sistólica. O encurtamento do VD pode ser medido longitudinalmente através do anel tricúspide na direção do ápice do VD (RYAN; MARSBOOM; ARCHER, 2013).

O TAPSE é o deslocamento sistólico longitudinal da base do VD em direção ao ápice do VD e caracteriza a função longitudinal desta câmara cardíaca (FORFIA; VACHIÉRY, 2012) refletindo o movimento sistólico de um único ponto do anel da tricúspide (KONSTAM et al., 2018; ERNANDE et al., 2013). É preconizado que quanto maior a movimentação

inferior da base na sístole, melhor a função sistólica do VD (RUDSKI et al., 2014). O TAPSE representa uma medida da função de encurtamento longitudinal do VD. Grande parte da fração de ejeção do VD resulta do encurtamento longitudinal desta câmara e representa um preditor confiável de prognóstico em adultos com HAP (RYAN et al., 2015). O grupo MCT apresentou redução do TAPSE em comparação ao grupo CTR e MCT + MEL. Uma diminuição do TAPSE, como observada nos animais que receberam apenas a monocrotalina, indica um prejuízo na função contrátil do VD, também demonstrado em outros estudos (RUITER et al., 2013; KIMURA et al., 2015). No grupo MCT + MEL não houve diferença estatística em relação ao grupo CTR. Para este parâmetro, a melatonina preveniu uma piora da contratilidade do VD, apesar da resistência aumentada. Esse achado é corroborado por outros autores, que mostram que a administração de melatonina é capaz de exercer efeitos benéficos sobre a função sistólica da câmara direita do coração (MAARMAN et al., 2015).

Outro parâmetro de contratilidade verificado foi a FAC. A FAC (%) é um dos métodos mais recomendados para estimativa quantitativa da função ventricular direita, sendo um parâmetro de avaliação da função global do VD (RUDSKI et al., 2014) e um preditor de insuficiência cardíaca (RYAN et al., 2015; RUDSKI et al., 2014). A função do VD é um importante determinante na capacidade funcional e do prognóstico quando a pós-carga está elevada (RYAN; ARCHER, 2014). A área fracionária de alteração do VD é definida como a porcentagem de alteração na área da câmara do VD entre a sístole e a diástole (BUENO; BERNARDO; SALGADO, 2015). A porcentagem de variação fracional da área (FAC) do VD, definida como  $(\text{área diastólica final do VD} - \text{área sistólica final do VD} - \text{área diastólica final do VD}) \times 100$ , é uma medida estimativa da função sistólica do VD que tem demonstrado boa correlação com a fração de ejeção do VD. A FAC (%) não se mostrou diferente entre os grupos experimentais.

O mesmo ocorreu com a FC e o débito sistólico, onde em nenhum dos grupos foi observado diferença expressiva. Mesmo com a contratilidade reduzida, os animais do grupo MCT não foram afetados por uma redução no débito sistólico.

Sabe-se que o coração apresenta muitos mecanismos compensatórios e a resposta hipertrófica é um deles. A hipertrofia do VD pode compensar o aumento da pós-carga e manter o débito sistólico (SANZ et al., 2019). De fato, o desenvolvimento de hipertrofia do VD nestes grupos que receberam a MCT pode ter contribuído para a manutenção da FAC e do débito sistólico. A FC não alterada nestes grupos que receberam a MCT pode ter contribuído para a

manutenção do débito sistólico. Nos estágios iniciais da HAP ocorre uma hipertrofia progressiva do VD que permite a manutenção dos diâmetros intracavitários e do volume sistólico, com pressões de enchimento normais. À medida que a doença progride o VD dilata-se como mecanismo compensatório para manter o débito sistólico. Somente em estágios mais avançados da doença é que os mecanismos compensatórios falham e o VD apresenta dilatação grave, apresentando regurgitação tricúspide progressiva, incapacidade de manter o débito cardíaco adequado (disfunção sistólica) e aumento das pressões de enchimento ventricular (disfunção diastólica) (DELGADO; PÉREZ; SUBÍAS, 2019). Como o protocolo experimental foi realizado por 21 dias, acredita-se que neste período analisado, o VD dos animais do grupo MCT, embora hipertrofiado, não se apresentava em estado insuficiente, mas ainda em estado adaptativo/compensatório, sendo capaz de manter o débito sistólico preservado.

Em relação aos parâmetros diastólicos do VD, as medidas utilizadas para avaliação da disfunção diastólica, foram o Pico E e o Pico A. O Pico E, corresponde à velocidade de enchimento lento do VD. Em relação a esse parâmetro, não houve diferença significativa em nenhum dos grupos. Depois, da fase de enchimento lento dos ventrículos ocorre a sístole atrial para completar a passagem de sangue dos átrios aos ventrículos. Esse momento corresponde ao Pico A. Nos grupos afetados pela HAP, que são os grupos MCT e MCT + MEL, a onda representativa da sístole do átrio direito (AD) está aumentada em comparação com o grupo CTR. Nos animais doentes a velocidade de enchimento está mais rápida, provavelmente por conta de uma elevada pressão dentro do VD, dificultando a sístole atrial, que acaba ocorrendo de forma mais rápida. Em relação a essa medida foi evidenciada uma alteração na capacidade sistólica dessa câmara cardíaca nos animais dos grupos MCT e MCT + MEL, sugerindo que o AD dos animais doentes pudesse estar hipertrofiado. Para esse parâmetro a melatonina não atenuou as alterações provocadas pela HAP no AD desses animais.

Sabe-se que a administração de MCT também promove redução no ganho de peso corporal (GEWEHR et al., 2019). Os grupos MCT e MCT + MEL tiveram menos ganho de peso em comparação ao grupo CTR, indicando uma influência da doença sobre o ganho de peso nesses animais. Essa redução no ganho de peso é consequência dos efeitos tóxicos da MCT no fígado e nos pulmões, o que ocasiona dificuldades respiratórias nestes animais que receberam MCT. Alterações vasculares que ocorrem nesse modelo de MCT possuem um

impacto funcional nas trocas gasosas resultando em alterações na capacidade ventilatória (GOMEZ - ARROYO et al., 2012). Animais doentes tendem a se alimentar menos por conta do agravamento da doença. Apesar de não ter sido realizado uma análise quantitativa em relação a ingestão de alimento, observou-se uma menor ingestão alimentar nos animais que receberam MCT. Outros estudos também evidenciaram redução do peso corporal dos animais que receberam MCT (ZIMMER et al., 2020; HESSEL et al., 2006; MORIMATSU et al., 2012).

A administração da MCT também induziu uma hipertrofia do VD. Esse resultado corresponde inicialmente a uma transformação adaptativa no VD desencadeada pela sobrecarga de pressão, reforçando o efeito da HAP no lado direito do coração. Com a evolução da HAP, o aumento da resistência vascular pulmonar causa uma hipertrofia ventricular direita em razão do aumento da sobrecarga do VD (GEWEHR et al., 2019). A hipertrofia ventricular direita foi avaliada pelo peso do VD/peso corporal. Os grupos MCT e MCT + MEL apresentaram hipertrofia do VD em relação ao grupo CTR. Sabe-se que a MCT não possui efeito cardíaco direto. A hipertrofia do VD é uma alteração característica da HAP em resposta ao aumento da resistência na artéria pulmonar (GOMEZ - ARROYO et al., 2012). A hipertrofia do VD também foi confirmada em outros estudos com administração de MCT (TÜRCK et al., 2020; HESSEL et al., 2006; COSTE, et al., 2017).

Apesar de um estudo prévio mostrar um efeito protetor da melatonina em relação à hipertrofia, no nosso trabalho, esse efeito não foi evidenciado. Isso pode se dar devido a diferenças na dose e no protocolo experimental utilizado. No estudo de Maarman e colaboradores, a dose de melatonina foi de 6 mg/Kg e foi administrada na água de beber dos animais (MAARMAN et al., 2015). De fato, essas diferenças podem ser responsáveis pelos diferentes resultados encontrados no nosso trabalho.

Outras importantes alterações decorrentes da progressão da HAP são as congestões hepática e pulmonar. O peso do pulmão dos animais dos grupos MCT e MCT + MEL foi significativamente maior se comparado com o grupo CTR. A melatonina não foi capaz de prevenir esse aumento. A congestão do pulmão foi avaliada pelo peso do pulmão/peso corporal. Os grupos MCT e MCT + MEL apresentaram congestão pulmonar em relação ao grupo CTR. Sabe-se que na HAP, a hiperplasia e proliferação de células nas diferentes camadas do endotélio vascular somado a presença de infiltrado inflamatório, podem contribuir para o aumento de peso e congestão do pulmão. (GOMEZ - ARROYO et al., 2012). Após a injeção de MCT os ratos sofrem reações inflamatórias graves, ocasionando lesões

no sistema vascular pulmonar e induzindo vasculite pulmonar (HESSEL et al., 2006 ; SANTOS-RIBEIRO et al., 2016). Outros estudos que utilizaram MCT como modelo indutor de HAP, também obtiveram esses resultados de aumento do peso do pulmão (HESSEL et al., 2006). Uma das características da MCT quando administrada em modelos animais, é a sua hepatotoxicidade (HONÓRIO JÚNIOR et al., 2010). Em relação ao fígado, os animais dos grupos MCT e MCT + MEL tiveram uma diminuição do peso em comparação ao grupo CTR. Uma explicação para a diminuição do peso do fígado seria um possível efeito tóxico da monocrotalina sobre os hepatócitos, levando a diminuição do número dessas células e diminuição do peso do órgão (GOMEZ - ARROYO et al., 2012 ). A congestão do fígado foi avaliada pela relação do peso do fígado/peso corporal e não apresentou diferença significativa entre os grupos. Outro estudo realizado com ratos machos e com a mesma dosagem de MCT também não encontrou congestão hepática, corroborando com nossos resultados (PACAGNELLI et al., 2016). Existem diferenças importantes entre as linhagens de ratos no que diz respeito à sua sensibilidade a MCT e, mesmo dentro de uma determinada linhagem, as diferenças interindividuais no tempo de início e na extensão da os efeitos tóxicos podem variar acentuadamente. Essas diferenças na suscetibilidade podem estar relacionadas à farmacocinética da MCT e possivelmente incluir diferenças na degradação e formação hepática do pirrol tóxico do MCT ou na conjugação e excreção (CAMPIAN, et al., 2006; STENMARK, et al., 2009).

Alterações bioquímicas também são características da HAP. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados no tecido pulmonar, foram analisados os níveis de ROS. Em relação à melatonina, estudos mostram que a mesma pode reagir diretamente com espécies reativas, atuando como *scavenger*, e também pode atuar aumentando a expressão e atividade de enzimas antioxidantes. Além disso, esse hormônio pode atuar reduzindo diretamente a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (SLOMINSKI et al., 2018) e melhorando a depuração destas espécies reativas de oxigênio (TORRES et al., 2015).

Semelhante aos nossos resultados avaliados in vivo, um estudo anterior mostrou que a melatonina foi capaz de proteger as células H9c2 contra lesões de I/R, reduzindo o estresse oxidativo (ZHANG et al., 2018). No presente estudo, os animais com HP apresentaram uma redução nos níveis de ROS em comparação com o grupo CTR. Esses resultados foram surpreendentes, uma vez que trabalhos anteriores do nosso laboratório demonstram a presença de estresse oxidativo e de infiltrado inflamatório no pulmão de ratos que receberam MCT, três

semanas após a injeção (ZIMMER et al., 2021). Além dos níveis menores dessas espécies reativas, os animais com HP também não apresentaram modificações em outros parâmetros de estresse oxidativo, como por exemplo, o dano aos lipídios avaliado pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Em relação a esse parâmetro, não existe diferença significativa quando comparamos os animais dos grupos doentes com o grupo CTR. No presente estudo foram também avaliados os seguintes parâmetros antioxidantes: níveis de sulfidrilas e a atividade da enzima catalase. No entanto, nenhum desses parâmetros foi diferente em relação ao grupo CTR. Em relação à enzima catalase, Zimmer e colaboradores também não encontraram diferença em relação a esse parâmetro no pulmão comparando os animais MCT com os animais CTR (ZIMMER et al., 2021). Uma possível hipótese para explicar esses resultados é que a redução das espécies reativas pode ter ocorrido pelo aumento de defesas antioxidantes não avaliadas no presente estudo. É possível que o sistema antioxidante enzimático pulmonar dos animais doentes possa ter respondido precocemente e dessa forma possa ter reduzido abaixo dos níveis do controle os níveis dessas espécies reativas. No entanto, como essa hipótese não foi testada, não podemos confirmar. No presente estudo foi avaliada também a expressão da enzima xantina oxidase, uma importante fonte de espécies reativas no pulmão. Em relação a essa avaliação, não houve diferenças entre os grupos.

Os níveis de nitritos, os quais são metabólitos do NO, também foram avaliados neste trabalho. Em relação a isso, um estudo recente do nosso laboratório demonstrou que a melatonina é capaz de aumentar a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e dessa forma melhorar a biodisponibilidade do NO na lesão miocárdica induzida pelo isoproterenol (SANTOS et al., 2024). No presente trabalho, no entanto, não encontramos diferenças estatísticas em relação aos níveis de nitritos entre os grupos.

## 8 CONCLUSÃO

Em conclusão, para esse estudo, o modelo experimental de HAP induzido por monocrotalina foi reproduzido com eficácia. Apesar de não termos detectado melhora em alguns parâmetros funcionais do VD, o tratamento com melatonina foi capaz de prevenir uma piora da contratilidade desta câmara cardíaca, apesar da resistência aumentada na artéria pulmonar. Além disso, os animais doentes apresentaram níveis reduzidos de ROS no tecido pulmonar. A inter-relação do estresse oxidativo com a HAP é um vasto campo a ser estudado, no que se refere a uma melhor compreensão destes mecanismos.

Embora não termos obtido muitos resultados significativos com a melatonina ao final do tratamento, a avaliação do papel da melatonina como agente protetor é um tema bastante importante a ser estudado. Os antioxidantes são alvo de estudos na prevenção de diversas doenças, como a HAP, por exemplo. Isso abre uma perspectiva de investigação para testarmos outras dosagens de melatonina e/ou outras formas de administração da melatonina como, por exemplo, na água de beber dos animais. Ingerir uma dose maior de melatonina ou fazer uma ingestão mais contínua da melatonina poderia se observar um outro efeito deste hormônio nos animais experimentais. Aumentar o número de animais experimentais, também poderia ampliar a probabilidade de se obter resultados significativos.

Para determinar quais fatores podem ter sido responsáveis por esses resultados, novas hipóteses precisariam ser testadas. Apesar dos efeitos benéficos da melatonina no sistema cardiovascular já serem conhecidos, até onde sabemos, esta pesquisa é um dos poucos estudos da ação deste hormônio sobre o estresse oxidativo no pulmão de ratos com HAP induzida por MCT.

Em resumo, a relevância deste estudo soma-se a outros trabalhos que utilizaram a melatonina como possibilidade terapêutica na prevenção e tratamento da HAP. Embora tenhamos detectado melhora em apenas um dos parâmetros de contratilidade dos animais tratados com melatonina, nossos resultados sugerem que a melatonina é de interesse na HAP, mas são necessários mais estudos sobre o seu potencial terapêutico na artéria e na vasculatura pulmonar e no VD, abrindo novas perspectivas na prevenção e tratamento desta doença.

## REFERÊNCIAS:

- ABE, K. et al. Haemodynamic unloading reverses occlusive vascular lesions in severe pulmonary hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 11, n. 1, p. 16-25, 2016.
- AGGARWAL, S. et al. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1011-1034, 2013.
- ALVES JR, 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, 2015.
- ALVES JR, J.L.; OLEAS, F.G.; SOUZA, R. Pulmonary Hypertension: Definition, Classification, and Diagnosis. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 38, n. 5, p. 561-570, 2017.
- ARAUJO, A.S. et al. A myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 249, n. 1-2, p. 133-139, 2006.
- ARCHER, S.L.; MICHELAKIS, E.D. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. **The new england journal o f medicine**, v. 361, n. 19, p. 1864-71, 2009.
- BALTATU, O.C. et al. Cardioprotective Melatonin: Translating from Proof-of-Concept Studies to Therapeutic Use. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 4342, 2019.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARRETO, A.C. et al. Hipertensão arterial pulmonar. Fisiopatologia, aspectos genéticos e resposta ao uso crônico de Sildenafil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 2, p. 147-154, 2005.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 328-338, 2001.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
- BRITTAIN, E. L. et al. Fatty Acid Metabolic Defects and Right Ventricular Lipotoxicity in Human Pulmonary Arterial Hypertension. **Circulation**, v. 133, n. 20, p. 1936-44, 2016.



BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, Elsevier, v. 52, p. 302-10, 1978.

BUENO, M.C.; BERNARDO, M.P.L.; SALGADO, A.A. Ecocardiografia na triagem e seguimento da hipertensão pulmonar. **Pulmão RJ**, v. 24, n. 2, p. 15-18, 2015.

BOSSONE, E. et al. Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2013.

CALDERARO, D. et al. Hipertensão Pulmonar na Prática do Cardiologista. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 3, p. 419-428, 2019.

CAMPIAN, M.E. et al. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? **Naunyn Schmiedeberg's Archives Pharmacology**, v. 373, n. 6, p. 391-400, 2006.

CAMPOS, E.B.P.; YOSHIDA, W.B. O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 4, p. 357-366, 2004.

CAMPOS, M.T.G.; LEME, F.O.P. Estresse Oxidativo: fisiopatologia e diagnóstico laboratorial. **PUBVET**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2018.

CAVE, A. et al. NADPH oxidase - derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 360, n. 1464, p. 2327-34, 2005.

CHAKRABORTY, S. et al. Correlation between lipid peroxidation-induced TBARS level and disease severity in obsessive-compulsive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 363-366, 2009.

CLAUSELL, N.; VIÉGAS, J. *In*: PEREIRA, E. **Insuficiência Cardíaca**. Rio de Janeiro: Med Line, 2012. P. 09-23.

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

COPPLE, B. L.; GANEY, P. E.; ROTH, R. A. Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 190, p. 155-169, 2003.

COSTE, F. et al. Chronic hypoxia aggravates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: a rodent relevant model to the human severe form of the Disease. **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, 2017.

DAS, R. et al. Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery. **International Journal of Cardiology**, v. 126, n. 3, p. 340-345, 2008.

- DELGADO, C.; PÉREZ, Á.; SUBÍAS, P. Hipertensión arterial pulmonar: progresión, pronóstico e impacto. **Insuficiencia cardíaca**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2019.
- DESAI, S.A.; CHANNICK, R.N. Exercise in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention**, v. 28, n. 1, p. 12-16, 2008.
- EL KASMI, K.C. et al. Adventitial fibroblasts induce a distinct proinflammatory/profibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension. **Journal of Immunology**, v. 193, n. 2, p. 597-609, 2014.
- ERNANDE, L. et al. Right isovolumic contraction velocity predicts survival in pulmonary hypertension. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 26, n. 3, p. 297-306, 2013.
- ESCRIBANO – SUBIAS, P. et al. Survival in pulmonary hypertension in Spain: insights from the Spanish registry. **European Respiratory Journal**, v. 40, n. 3, p. 596-603, 2012.
- FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, I. C. F. R; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, ano IV, n. 2, p. 32-39, 2007.
- FERNANDES, C. J. et al. Atualização no tratamento da hipertensão arterial pulmonars. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, n. 4, p. 750-764, 2021.
- FLORES VALDEZ, N. Endotelina-1: vaso vasoconstrictor intrínseco del endotelio vascular. **Revista Med**, v. 21, n. 2, p. 64-78, 2013.
- FORFIA, P.R.; VACHIÉRY, J.L. Echocardiography in pulmonary arterial hypertension. **The American Journal of Cardiology**, v. 110, n. 6, p. 16S-24S, 2012.
- FROST, A. E. et al. The Changing Picture of Patients With Pulmonary Arterial Hypertension in the United States How REVEAL Differs From Historic and Non-US Contemporary Registries. **Chest**, v. 139, n. 1, p. 128-137, 2011.
- GHANI, M. A. et al. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, v. 230, p. 195-207, 2017.
- GEWEHR, D.M. et al. Lesões plexiformes em modelo experimental de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 3, p. 480-490, 2019.
- GHIO, S. et al. Clinical and prognostic relevance of echocardiographic evaluation of right ventricular geometry in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **The American Journal of Cardiology**, v. 107, n. 4, p. 628-632, 2011.

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, 2012.

GRANGER, D.L. et al. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. **Methods in Enzymology**, v. 301, p. 49-61, 1999.

GRUSS, A.I. et al. Diez años de experiencia de un centro de referencia em hipertensión arterial pulmonar en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, Montevideo, v. 35, n. 3, p. 193-202, 2019.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HARTNEY, T. et al. Xanthine oxidase-derived ROS upregulate Egr-1 via ERK1/2 in PA smooth muscle cells; model to test impact of extracellular ROS in chronic hypoxia. **Plos One**, v. 6, n. 11, p. 27531, 2011.

HESSEL, M.M.H 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. H 2424-2430, 2006.

HILL, N.S.; GILESPIE, M.N.; MCMURTRY I.F. Fifty Years of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension: What Has It Meant to the Field? **Chest**, v. 152, n. 6, p. 1106-1108, 2017.

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, 2013.

HOEPER, M.M.; GIBBS, J. Simon. R. The changing landscape of pulmonary arterial hypertension and implications for patient care. **European Respiratory Review**, v.134, n. 23, p. 450-457, 2014.

HOEPER, M.M. et al. A global view of pulmonary hypertension. **The Lancet Respiratory Medicine**, Lancet Publishing Group, 2016.

HONÓRIO JÚNIOR, J. E. R; Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 453-458, 2010.

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. 09, p. 1023-30, 2006.

JIN, H. et al. Melatonin attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting the inflammation and the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 4, p. 442-450, 2014.

- 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.
- KASAHARA, Y. et al. Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 124-129, 1997.
- KIMURA, K. et al. Evaluation of right ventricle by speckle tracking and conventional echocardiography in rats with right ventricular heart failure. **International Heart Journal**, v. 56, n. 3, p. 349-53, 2015.
- KISHIKI, K. et al. Impact of Severe Pulmonary Arterial Hypertension on the Left Heart and Prognostic Implications. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 32, n. 9, p. 1128-1137, 2019.
- KLEIN, D.; KERN, R.M.; SOKOL, R.Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 36, n. 1, p. 59-66, 1995.
- KONSTAM, M.A. et al. Evaluation and Management of Right-Sided Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 20, p. 578-622, 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.
- LAI, Y.C. et al. Pulmonary arterial hypertension: The clinical syndrome. **Circulation Research**, v.115, n. 1, p. 115-130, 2014.
- LAN, N. et al. Pulmonary Arterial Hypertension: Pathophysiology and Treatment. **Diseases**, v. 6, n. 2, p. 38, 2018.
- LAU, E. M. T. et al. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, v. 14, n. 10, p. 603–614, 2017.
- LEATHER, H.A. et al. Longitudinal but not circumferential deformation reflects global contractile function in the right ventricle with open pericardium. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 6, p. H2369 –H2375, 2006.
- LEBEL, C.P.; Ischiropoulos, Harry; Bondy, Stephen C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research Toxicology**, v.5, n.2, p. 227-31, 1992.
- LLESUY, S.F.; MILEI, J.; MOLINA, H. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumory Journal**, v. 71, n. 3, p. 241-9, 1985.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MA, L. et al. TLR4 regulates pulmonary vascular homeostasis and remodeling via redox signaling. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 21, p. 397-409, 2016.
- MACHUCA, T. N.; DE PERROT, M. Mechanical Support for the Failing Right Ventricle in Patients With Precapillary Pulmonary Hypertension. **Circulation**. v. 132, n. 6, p. 161-163, 2015.
- MACLEAN, M.R. Melatonin: shining some light on pulmonary hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 116, n. 13, p. 2036-2037, 2020.
- MARTINS JÚNIOR, L. Hipertensão pulmonar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.16, n.4, p.161-163, 2014.
- MAARMAN, G.J. et al. Melatonin as a preventive and curative therapy against pulmonary hypertension. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 3, p. 343-353, 2015.
- MAARMAN, G.J. Natural Antioxidants as Potential Therapy, and a Promising Role for Melatonin Against Pulmonary Hypertension. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 967, p. 161-178, 2017.
- MAARMAN, G.J.; LECOUR, S. Melatonin against pulmonary arterial hypertension: is it ready for testing in patients? **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 32, n. 2, p. 111-112, 2021.
- MCGOON, M.D. et al. Pulmonary Arterial Hypertension: Epidemiology and Registries. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25, p. 51-59, 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**, 2009.
- MENDES, A. P. A.; PEREIRA, R. C.; ANGELIS PEREIRA, M. C. D. *In*: CORDEIRO, C. A. M. **Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos**. 1 ed. Guarujá, SP: Científica, 2020, p. 296-312, v.2: Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: conceitos fundamentais sob os aspectos da nutrição e da ciência dos alimentos.
- MORIMATSU, Y. et al. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. **Journal of Vascular Research**, v. 49, n. 1, p. 33-42, 2012.

NANDI, A. et al. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

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

OLIVEIRA-JUNIOR, S.A. et al. Efeito Cardioprotetor do Exercício Resistido no Remodelamento Ventricular Esquerdo Associado à Hipertensão Arterial Pulmonar Induzida por Monocrotalina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.119, n.4, p. 585-586, 2022.

PACAGNELLI, F.L. et al. Preventive aerobic training exerts a cardioprotective effect on rats treated with monocrotaline. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 97, n. 3, p. 238-247, 2016.

PARIKH, V.; BHARDWAJ, A.; NAIR, A. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension. **Journal of Thoracic Disease**, v. 11, n. 14, p. 1767-1781, 2019.

PRIETO, M.A. et al. The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 33, p. 11751-11761, 2009.

QIU, H. et al. The Role of Regulatory T Cells in Pulmonary Arterial Hypertension. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 23, 2019.

RABINOVITCH, M. et al. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **Circulation Research**, v. 115, n. 1, p. 165-175, 2014.

RUDSKI, L.G. et al. Diretrizes para Avaliação Ecocardiográfica do Coração Direito em Adultos: Um Informe da Sociedade Americana de Ecocardiografia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia – Imagem Cardiovascular**, v. 27, n.2, p. 47-82, 2014.

RUFINO, R. et al. Hipertensão arterial pulmonar: uma proposta multidisciplinar. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 61-73, 2013.

RUITER, G. et al. Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. **The European Respiratory Journal**, v. 42, n. 2, p. 553-6, 2013.

RYAN, J.J.; MARSBOOM, Glenn; ARCHER, Stephen L. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 218, p. 105-49, 2013.

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, 2014.

RYAN, J.J. et al. Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 391-406, 2015.

RYAN, J.J.; ARCHER, S.L. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension: part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 131, n. 19, p. 1691-702, 2015.

SACHDEV, A. et al. Right ventricular strain for prediction of survival in patients with pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 139, n. 6, p. 1299-1309, 2011.

SAES/MS, Secretaria de atenção especializada à saúde/ Ministério da Saúde. **Portaria Conjunta, n.10, de 18 de julho de 2023. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hipertensão Pulmonar**. Brasil, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/protocolos-clinicos-e-diretrizes-terapeuticaspcdt/arquivos/2023/portaria-conjunta-no-10-pcdt-hipertensao-pulmonar.pdf>. Acesso em: 03 nov.2023.

SAHAY, S. Evaluation and classification of pulmonary arterial hypertension. **Journal of Thoracic Disease**, v. 11, n. 14, p. S1789- S1799, 2019.

SANTOS, R. et al. Melatonin improves nitric oxide bioavailability in isoproterenol induced myocardial injury. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 591, 2024.

SANTOS - RIBEIRO, D. et al. Pulmonary arterial hypertension: Basic knowledge for clinicians. **Archives of Cardiovascular Diseases**, v. 109, 2016.

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**, v. 73, n. 12, p. 1463-1482, 2019.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. 453-462, 2014.

SCHOMERUS, C.; KORF, H.W. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1057, n.1, p. 372-383, 2005.

SCHORÖDER, E.; EATON, P. Hydrogen peroxide as an endogenous mediator and exogenous tool in cardiovascular research: issues and considerations. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 153-159, 2008.

SCHULTZE, A.E; ROTH, R.A. Chronic Pulmonary Hypertension – The Monocrotaline model and Involvement of the Hemostatic System. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B Critical Reviews**, v. 1, n. 4, p. 271-346, 1998.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? **Nutrients**, v. 11, n. 9, p.2090, 2019.

SHARMA, S. et al. Lung antioxidant enzymes are regulated by development and increased pulmonary blood flow. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 293, n. 4, p. 960-971, 2007.

SHEHATA, M.L. et al. Myocardial delayed enhancement in pulmonary hypertension: pulmonary hemodynamics, right ventricular function, and remodeling. **AJR American Journal of Roentgenology**, v. 196, n. 1, p. 87-94, 2011.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D.P. Oxidative Stress. **Annual Review Biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SILVA, C.T.D.S.; JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2014.

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

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

SLOMINSKI, A.T. et al. Melatonin: A Cutaneous Perspective on its Production, Metabolism, and Functions. **The Journal Investigative Dermatology**, v. 138, n. 3, p. 490-499, 2018.

SOON, E. et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 122, n. 9, p. 920-7, 2010.

STENMARK, K.R. et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 297, n. 6, p. 13-32, 2009.

STRANGE, G. et al. Survival of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patients in the Modern Era 4 in Australia and New Zealand. **Heart, Lung and Circulation**, v. 27, n. 11, p. 1368-1375, 2017.

SUN, H.; GUSDON, A.M.; QU, S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. **Current Opinion in Lipidology**, v. 27, n. 4, p. 408-413, 2016.



- TAN, D.X. et al. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18886-18906, 2015.
- TAYLOR, D.W. et al. Comparative Cytotoxicity of Monocrotaline and Its Metabolites in Cultured Pulmonary Artery Endothelial Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 196-204, 1997.
- THENAPPAN, T. et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. **BMJ - British Medical Journal**, v. 360: j5492, 2018.
- TORRES, F. et al. Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 3, p. 362-73, 2015.
- TUDER, R.M. et al. Pathology of pulmonary hypertension. **Clinics in Chest Medicine**, v. 28, n. 1, p. 23-42, 2007.
- TUDER, R.M. et al. Relevant Issues in the Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25, p. 4-12, 2013.
- TÜRCK, P. et al. Blueberry extract decreases oxidative stress and improves functional parameters in lungs from rats with pulmonary arterial hypertension. **Nutrition**, v. 70, 2020.
- TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-44, 2003.
- VAILLANCOURT, M. et al. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 4, p. 407-15, 2015.
- VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VELLOSA, J.C.R. et al. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152- 10168, 2021.
- VENTETUOLO, C.E. et al. Sex and haemodynamics in pulmonary arterial hypertension. **The European Respiratory Journal**, v. 43, n. 2, p. 523-530, 2014.
- WIJERATNE, T.D. et al. Increasing Incidence and Prevalence of WHO Groups 1–4 Pulmonary Hypertension: A Population-Based Cohort Study in Ontario, Canada. **Circulation. Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 11, n. 2, 2018.
- XU, L. et al. Melatonin differentially regulates pathological and physiological cardiac hypertrophy: Crucial role of circadian nuclear receptor ROR $\alpha$  signaling. **Journal of Pineal Research**, v. 67, n. 2, 2019.
- YOO, H.H.B. Ecocardiografia Transtorácica na Hipertensão Pulmonar: Ferramenta Fácil, mas é Preciso Cautela. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 120, n. 7, e.20230380, 2023.

YUAN, J.X. et al. Dysfunctional voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 98, n. 14, p. 1400-06, 1998.

ZHANG, H. et al. Metabolic and Proliferative State of Vascular Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension Is Regulated Through a MicroRNA-124/PTBP1 (Polypyrimidine Tract Binding Protein 1)/Pyruvate Kinase Muscle Axis. **Circulation**, v. 136, n. 25, p. 2468-2485, 2017.

ZHANG, Y. et al. Melatonin protects H9c2 cells against ischemia/reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress via activation of the Nrf2 signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 3, p. 3497-3505, 2018.

ZIMMER, A. et al. Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 464, n. 1-2, p. 93-109, 2020.

ZIMMER, A. et al. The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity. **European Journal of Pharmacology**, v. 891, 2021.

## ANEXO 1 CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



**UFRGS**  
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: 40696

Título: USO DA MELATONINA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR E SEUS EFEITOS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A VIA INFLAMATÓRIA TLR4/NFKB NO PULMÃO E NA ARTÉRIA PULMONAR DE RATOS

Vigência: 12/05/2021 à 12/04/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Alexandre Luz de Castro - coordenador desde 12/05/2021

Cristiane Dias Lisboa - desde 12/05/2021

ALEX SÁNDER DA ROSA ARAUJO - pesquisador desde 12/05/2021

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 120 ratos Wistar macho provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório - 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, 20 de Agosto de 2021

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA  
Coordenador da comissão de ética