

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**EFEITOS DO TRAPIDIL SOBRE O ESTADO REDOX E O REMODELAMENTO DO
VENTRÍCULO DIREITO NO MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR
INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

PATRICK TÜRCK

Porto Alegre

2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

EFEITOS DO TRAPIDIL SOBRE O ESTADO REDOX E O REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO NO MODELO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA

Patrick Türck

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por ter sido mãe e pai durante tanto tempo, por nunca ter deixado me faltar nada e por ser exemplo de educação e caráter.

À minha irmã, pelos cuidados, apoio e carinho.

À minha namorada Débora, pela paciência, compreensão e amor, por tornar tudo mais leve.

Ao meu amigo Bruno, pelos vários momentos de companheirismo e alegria.

Ao meu orientador Alex Sander Araujo, pelos grandes aprendizados, pela dedicação com os alunos, pelo aspecto motivacional e pela alegria com que encara a vida.

À professora Adriane Belló-Klein, em especial pela generosidade em relação às pessoas que a cercam, exemplo de pessoas sábias.

Ao professor Paulo Schenkel, pela atenção, bom-humor e prontidão em resolver problemas e ajudar os outros.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (UFRGS) pelo esforço e dedicação a esse trabalho, em especial à Cristina Campos e Denise Lacerda.

À Tânia Regina Fernandes, pela competência e dedicação com que atua em todos os trabalhos desenvolvidos no laboratório, incluindo este.

Aos colegas do LaMEC pelo companheirismo, em especial ao amigo Samir Khal de Souza.

À banca que avalia essa dissertação, pelo interesse e tempo disponibilizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia e à UFRGS, pelas oportunidades e estruturas disponíveis para realização deste trabalho.

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença progressiva caracterizada por aumento da resistência vascular pulmonar e consequente aumento da pós-carga do ventrículo direito, levando à insuficiência ventricular direita e morte. Distúrbios entre vasodilatadores e vasoconstritores são consequências agravadas por desequilíbrios redox presentes na HAP. O Trepidil é uma droga antiplaquetária, antimiotogênica e inibidora de fosfodiesterase usada atualmente na clínica para prevenir a restenose. Estudos recentes também descrevem a capacidade do fármaco de melhorar o equilíbrio redox, diminuindo a peroxidação lipídica e formação de superóxido. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi verificar os efeitos do Trepidil no modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina, avaliando o estado redox e o remodelamento cardíaco.

Para isso, foram utilizados ratos Wistar com 5 semanas de idade divididos em quatro grupos: Controle, Controle + Trepidil, Monocrotalina e Monocrotalina + Trepidil. A HAP foi induzida com uma injeção intraperitoneal de monocrotalina 60 mg/kg no dia 0. O tratamento com o Trepidil começou no dia 7 (5 mg/kg/dia – Experimento 1 ou 8 mg/kg/dia – Experimento 2) até o dia 14, quando os animais foram sacrificados logo após ecocardiografia e cateterismo do ventrículo direito. O coração foi isolado, separado em ventrículo direito e esquerdo (VD e VE), pesado e armazenado para análises de expressão proteica (SERCA, Fosfolambam, p-Fosfolambam e RyR) e bioquímica do estado redox.

Observamos aumento da congestão hepática e da hipertrofia do VD nos animais que receberam monocrotalina. O Trepidil (5 mg/kg/dia) foi capaz de reduzir a congestão hepática, entretanto não reduziu a hipertrofia do VD. A pressão sistólica e as derivadas pressão/tempo positiva e negativa se mostraram aumentadas nos animais com indução da HAP, enquanto que os animais que receberam o fármaco (8 mg/kg/dia) apresentaram derivadas pressão/volume positivas com valores não diferentes do grupo Controle. Houve aumento dos diâmetros diastólico e sistólico do VD nos grupos que receberam monocrotalina, indicando dilatação da câmara. Já o tratamento com Trepidil (5 mg/kg/dia) reduziu esses diâmetros. Funcionalmente, observamos diminuição da fração de encurtamento, razão pico E/A e TAPSE nos grupos que receberam monocrotalina, sendo que o fármaco não modificou esses parâmetros. A análise do estado redox demonstrou maior lipoperoxidação e atividade da glutathione peroxidase nos grupos monocrotalina, já o tratamento com Trepidil (8 mg/kg/dia) reduziu a atividade de NADPH oxidases e aumentou a razão GSH/glutathionas totais. A expressão proteica de Fosfolambam no VD aparece diminuída nos grupos monocrotalina; a expressão proteica de SERCA e RyR aparece aumentada nos grupos que receberam Trepidil (8 mg/kg/dia).

Os dados observados sugerem que o Trepidil induz uma melhora do remodelamento cardíaco direito em modelo de HAP induzida por monocrotalina. A melhora do balanço redox e maior expressão de SERCA e RyR sem aumento da derivada pressão/volume positiva indica que os animais tratados com o fármaco podem estar mais preparados para enfrentar a progressão da doença.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disease characterized by increased pulmonary vascular resistance and consequent increased afterload of the right ventricle, leading to right ventricular failure and death. PAH disorders between vasodilators and vasoconstrictors are consequences aggravated by redox imbalances present in the disease. Trepidil is an antiplatelet, phosphodiesterase's inhibitory and antimitogenic drug currently used in the clinic to prevent restenosis. Recent studies also describe the ability of Trepidil to enhance the redox balance by decreasing lipid peroxidation and superoxide formation. In this way, the objective of this study was to assess the effects of Trepidil in pulmonary arterial hypertension model induced by monocrotaline, evaluating the redox state and cardiac remodeling.

Male Wistar rats (5 weeks old) were divided into four groups: Control; Control + Trepidil; Monocrotaline; Monocrotaline + Trepidil. PAH was induced with an intraperitoneal injection of monocrotaline 60mg/kg on day 0. Treatment with Trepidil started on day 7 (5 mg / kg / day - Experiment 1 or 8 mg / kg / day - Experiment 2) until day 14, when the animals were sacrificed after echocardiography and catheterization of the right ventricle. The heart was isolated, separated into right and left ventricle (RV and LV), weighed and stored for protein expression analysis (SERCA, phospholamban, p-phospholamban and RyR) and biochemistry analysis of redox balance.

We observed increased hepatic congestion and RV hypertrophy in animals that received monocrotaline. Trepidil (5 mg/kg/day) was able to reduce the hepatic congestion, though not reduced RV's hypertrophy. The systolic pressure and positive and negative pressure/time derivatives have shown increased in animals with induced PAH, whereas animals given the drug (8 mg/kg/day) positive pressure/time derivative values were not different compared to Control group. We also observed an increase of RV's diastolic and systolic diameters in the groups that received monocrotaline, indicating dilatation of the chamber, as treatment with Trepidil (5mg/kg/day) reduced these diameters. Functionally, we observed a decrease of fractional shortening, peak E/A ratio and TAPSE in the groups that received monocrotaline, whereas Trepidil did not modify these parameters. The analysis of the redox state showed higher lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity in groups with induced PAH. Treatment with Trepidil (8 mg/kg/day) reduced the activity of NADPH oxidases and increased the GSH/total glutathiones ratio. Protein expression of phospholamban in RV appears diminished in monocrotaline groups; protein expression of RyR and SERCA appears enhanced in the groups treated with Trepidil (8 mg/kg/day).

The observed data suggest that the Trepidil induces an improvement in right ventricle remodeling in the model of PAH induced by monocrotaline. The improvement in the redox balance and increased expression of RyR and SERCA without increasing the positive pressure/volume derivative indicates that animals treated with the Trepidil may be more prepared to face the progression of the disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina

BMPR2 – receptor para a proteína morfogenética óssea tipo 2

CAT – catalase

cGMP - monofosfato cíclico de guanosina

DdVD – diâmetro diastólico do ventrículo direito

dP/dT – derivada pressão/volume

DsVD – diâmetro sistólico do ventrículo direito

EGF – fator de crescimento endotelial

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EO – estresse oxidativo

ERN – espécie reativa de nitrogênio

ERO – espécie reativa de oxigênio

ET_A – endotelina A

ET_B – endotelina B

ETC – cadeia transportadora de elétrons

FECVD – fração de encurtamento do ventrículo direito

GPx – glutathione peroxidase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

HAP – hipertensão arterial pulmonar

HP – hipertensão pulmonar

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

IPM – índice de performance do miocárdio (ventrículo direito)

MC – massa corporal

MCT – monocrotalina

NIH – National Institutes of Health

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

Nox – NADPH oxidase

PAD – pressão no átrio direito

PAP – pressão arterial pulmonar

PDGF – fator de crescimento derivado de plaqueta

PMAP – pressão média na artéria pulmonar

PSVD – pressão sistólica no ventrículo direito

RVP – resistência vascular pulmonar

RVS – resistência vascular sistêmica

SOD – superóxido dismutase

TAC/TEJ – tempo de aceleração/tempo de ejeção

TAPSE - excursão sistólica no plano do anel da tricúspide

TGF- β – fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

VD – ventrículo direito

VE – ventrículo esquerdo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da Hipertensão Pulmonar baseada no Quinto Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, 2013.

Tabela 2. Parâmetros morfométricos dos pulmões e fígado para os diferentes grupos experimentais (Experimento 1).

Tabela 3. Parâmetros morfométricos do coração - Índices utilizados para avaliação da hipertrofia cardíaca nos diferentes grupos experimentais (Experimento 1).

Tabela 4. Dados obtidos através do cateterismo do VD para os diferentes grupos experimentais (Experimento 1).

Tabela 5. Parâmetros obtidos durante a ecocardiografia para os diferentes grupos experimentais (Experimento 1).

Tabela 6. Parâmetros do estado redox do ventrículo direito nos diferentes grupos experimentais (Experimento 1).

Tabela 7. Parâmetros morfométricos dos pulmões e fígado para os diferentes grupos experimentais (Experimento 2).

Tabela 8. Parâmetros morfométricos do coração - Índices utilizados para avaliação da hipertrofia cardíaca nos diferentes grupos experimentais (Experimento 2).

Tabela 9. Pressões e derivadas de contratilidade (máxima) e de relaxamento (mínima) medidas nos ventrículos direitos dos animais (Experimento 2).

Tabela 10. Parâmetros do estado redox do ventrículo direito nos diferentes grupos experimentais (Experimento 2).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão apical quatro câmaras do coração de rato Wistar, realizada durante este trabalho. Medidas da área do ventrículo direito e dos diâmetros medial e basal dos ventrículos direito e esquerdo.

Figura 2: Medidas do fluxo pela tricúspide de rato Wistar, realizadas durante este trabalho.

Figura 3. Medida de TAPSE de rato Wistar em modo M realizada durante este trabalho.

Figura 4. Estrutura química do fármaco Trapidil.

Figura 5. Análise do conteúdo da proteína SERCA (97 KDa) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot.

Figura 6. Análise do conteúdo da proteína Fosfolambam (25 KDa) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot.

Figura 7. Análise do conteúdo da isoforma fosforilada da proteína Fosfolambam (p-Fosfolambam) (27 KDa) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot.

Figura 8. Análise do conteúdo da proteína RyR (552 KDa) no tecido ventricular direito pela técnica de Western Blot.

Figura 9. Resumos dos principais achados nesse estudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar.....	12
1.1.1. Definição e Diagnóstico.....	12
1.1.2. Epidemiologia.....	18
1.2.3. Patobiologia.....	20
1.2. Modelo Animal para a HAP: Monocrotalina.....	22
1.3. Estresse Oxidativo na HAP.....	24
1.4. Trapidil.....	26
2. HIPÓTESE	29
3. OBJETIVOS	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 Animais	31
4.1.1 Dimensionamento Amostral.....	31
4.1.2 Considerações Éticas.....	31
4.2 Grupos Experimentais.....	32
4.2.1 Protocolo Experimental.....	32
4.2.2 Indução da HAP.....	32
4.2.3 Administração do Trapidil.....	32
4.3 Eutanásia dos Animais.....	33
4.4 Análises Funcionais do Ventrículo Direito.....	33
4.4.1 Ecocardiografia.....	33
4.4.2 Registro de Pressão Ventricular Direita.....	33
4.5 Análises Morfométricas do Ventrículo Direito, Pulmões e Fígado.....	34
4.6 Preparação dos Homogeneizados e Análises do Estado Redox do Ventrículo Direito.....	35
4.6.1 Determinação da Peroxidação de Lipídios.....	35
4.6.2 Determinação do Conteúdo de Sulfidrilas.....	35
4.6.3 Atividade da Catalase.....	35
4.6.4 Atividade da Superóxido Dismutase.....	36

4.6.5 Atividade da Glutathiona Peroxidase.....	36
4.6.6 Atividade da NADPH Oxidase.....	37
4.6.7 Glutathionas Totais e Reduzidas.....	37
4.6.8 Dosagem da Concentração de Peróxido de Hidrogênio.....	38
4.6.9 Quantificação das Proteínas.....	38
4.7 Análise da Expressão Proteica por <i>Western Blot</i>	38
4.8 Estatística.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1 Experimento 1 (Dose de Trapidil 5 mg/kg/dia).....	40
5.1.1 Análises Morfométricas.....	40
5.1.1.1 Congestão Pulmonar e Hepática.....	40
5.1.1.2 Hipertrofia Cardíaca.....	41
5.1.2 Registros de Pressão do VD.....	42
5.1.3 Dados Ecocardiográficos.....	42
5.1.4 Dados do Balanço Redox no Ventrículo Direito.....	44
5.2 Experimento 2 (Dose de Trapidil 8 mg/kg/dia).....	45
5.2.1 Análises Morfométricas.....	45
5.2.1.1 Hipertrofia Cardíaca.....	45
5.2.2 Registros de Pressão do VD.....	46
5.2.3 Dados do Balanço Redox no Ventrículo Direito.....	46
5.2.4 Imunoconteúdo de Proteínas Analisadas por <i>Western Blot</i>	48
6. DISCUSSÃO CONCLUSIVA.....	51
7. PERSPECTIVAS.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial Pulmonar

1.1.1 Definição e Diagnóstico

A hipertensão pulmonar (HP) é uma comorbidade comum a muitas doenças cardíacas e pulmonares, para as quais a condição do leito vascular pulmonar frequentemente é a principal determinante das manifestações clínicas, do prognóstico e da exequibilidade do tratamento. A circulação pulmonar é de baixa resistência, sendo as pressões sistólica e diastólica na faixa de 15 a 25 mmHg e 5 a 10 mmHg, respectivamente, em indivíduos normais na posição supina. A grande área agregada da circulação pulmonar é responsável por essa baixa resistência, que se reflete na escassez da musculatura dos vasos de resistência pulmonares, no grande escape de sangue da árvore arterial pulmonar durante cada sístole, na grande capacidade e expansibilidade da árvore arterial pulmonar e no grande número de minúsculos vasos mantidos em reserva. Como resultado, mesmo durante um esforço físico, um aumento considerável no fluxo sanguíneo pulmonar desencadeia apenas um aumento moderado na pressão arterial pulmonar (Goldman Cecil Medicina, 2010).

A HP tem sido caracterizada em indivíduos que apresentam uma pressão média na artéria pulmonar (PMAP) ≥ 25 mmHg em repouso. O normal em indivíduos saudáveis é o valor de PMAP de até 20 mmHg, sendo que pessoas com pressões entre 21 e 24 mmHg devem ser monitoradas cuidadosamente, particularmente quando apresentarem risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial pulmonar (situações em que há casos na família de hipertensão arterial pulmonar hereditária, por exemplo) (Hoepfer, Marius et al. 2013). Ainda, o subgrupo da HP conhecido como hipertensão arterial pulmonar (HAP) apresenta o critério de que a pressão de oclusão da artéria pulmonar deve ser ≤ 15 mmHg. Algumas definições incluem também a resistência vascular pulmonar ≥ 3 unidades de Wood, o que tem demonstrado um aumento na especificidade para diagnóstico da HAP (Badesch, David et al. 2009).

A classificação geral da doença se mantém desde 2013, quando ocorreu o Quinto Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar em Nice, na França, sendo a HP classificada em cinco grandes grupos: (1) hipertensão arterial pulmonar; (2)

hipertensão pulmonar devido a doenças cardíacas do lado esquerdo; (3) hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia; (4) hipertensão pulmonar crônica tromboembólica; (5) hipertensão pulmonar com mecanismo multifatoriais desconhecidos (Simonneau, G erald et al. 2013) (Tabela 1).

Em relação à HAP, a qual compreende o grupo 1, sua origem pode ocorrer de diversas maneiras: idiopática; hereditária (principalmente devido a mutações no gene onde se localiza o receptor tipo 2 da proteína morfogenética óssea – BMPR2); associada com drogas ou toxinas; ou ser decorrente de condições associadas com HAP (como, por exemplo, infecção por HIV, doenças do tecido conjuntivo, hipertensão portal, esquistossomose, entre outras causas).

Tabela 1. Classificação da Hipertensão Pulmonar baseada no Quinto S mpoio Mundial de Hipertensão Pulmonar, 2013.

Grupo 1: Hipertensão Arterial Pulmonar
1.1 Idiopática
1.2 Heridit�ria
1.2.1 BMPR2
1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.2.3 Desconhecida
1.3 Induzida por drogas ou toxinas
1.4 Associada com:
1.4.1. Doença do tecido conectivo
1.4.2 Infecção por HIV
1.4.3 Hipertensão portal
1.4.4 Doenças card�cias congestivas
1.4.5 Esquistossomose
1' Doença veno-oclusiva pulmonar e/ou hemangiomatose dos capilares pulmonares
1'' Hipertensão pulmonar persistente do recém nascido
Grupo 2: Hipertensão pulmonar devido a doença cardiovascular esquerda
2.1 Disfunção ventricular sistólica esquerda
2.2 Disfunção ventricular diastólica esquerda

2.3 Doença valvular
2.4 Obstrução do fluxo cardíaco esquerdo e cardiomiopatias congênitas
3. Hipertensão pulmonar devido a doenças pulmonares e/ou hipóxia
3.1 Doença obstrutiva pulmonar crônica
3.2 Doença intersticial pulmonar
3.3 Outras doenças pulmonares com padrão restritivo e obstrutivo
3.4 Distúrbios respiratórios do sono
3.5 Distúrbios da hipoventilação alveolar
3.6 Exposição crônica à altitude
3.7 Anomalias do desenvolvimento pulmonar
4. Hipertensão pulmonar devido à trombose crônica ou embolismo
5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais
5.1 Distúrbios hematológicos: anemia crônico-hemolítica, esplenectomia
5.2 Distúrbios sistêmicos: sarcoidose, histiocitose pulmonar
5.3 Distúrbios metabólicos: distúrbios da tireoide, doença de Gaucher
5.4 Obstrução tumoral, falência renal crônica, hipertensão pulmonar segmental

Como na HAP há perda da capacidade do leito vascular pulmonar de se dilatar e recrutar uma vasculatura não utilizada para acomodar aumentos no fluxo sanguíneo, ocorre aumento da pressão na artéria pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito em resposta à elevação de pós-carga. Esse quadro, que resulta na progressiva disfunção ventricular direita, recebe o nome de *cor pulmonale*.

O *cor pulmonale* se origina da sobrecarga de pressão ao ventrículo direito (VD) e é caracterizado por hipertrofia, dilatação e insuficiência do VD secundária à hipertensão pulmonar. No *cor pulmonale* crônico pode ocorrer também a compressão da câmara ventricular esquerda em decorrência do ventrículo direito hipertrofiado, o que pode levar à regurgitação tricúspide com espessamento fibroso da valva (Robbins & Cotran, 2006). Estima-se que o *cor pulmonale* represente cerca de 7 a 10% de todas as doenças cardíacas (LEHRMAN et al., 2002).

Os sintomas iniciais da HAP, como dispneia, tontura e fadiga são geralmente suaves e comuns a diversas outras doenças. Em repouso, inicialmente, não se observa sintomas ou sinais aparentes da doença. Como resultado, o tempo do

estabelecimento da doença até o diagnóstico é, em média, maior de 2 anos (Humbert, Marc et al. 2006; Badesch David et al. 2011). Além disso, a HAP é uma doença de difícil diagnóstico, que requer investigações invasivas e significativa experiência no cuidado com os pacientes. Assim, as diretrizes atuais recomendam que os pacientes devam ser avaliados por centros especializados para diagnóstico e tratamento de doenças pulmonares (Gaine e Rubin, 1998; Barst, Robyn et al. 2009). Uma vez que haja suspeitas de HAP, o intuito é de confirmar ou excluir o diagnóstico e, se presente, estabelecer a etiologia, analisar a severidade e decidir as estratégias subsequentes para o tratamento. A natureza não específica dos sintomas associados com a HAP faz com que o diagnóstico não possa ser dado baseando-se na presença ou ausência de sintomas sozinhos, mas em uma sequência lógica de passos. Essa sequência tem sido formalizada em diretrizes, como a Diretriz Europeia para Diagnóstico e Tratamento da HAP. O processo de avaliação de um paciente com suspeita de HAP envolve uma série de investigações para se determinar se há a possibilidade da presença de HAP, para se confirmar o diagnóstico baseado em testes não invasivos iniciais, para se esclarecer a etiologia, para se avaliar prejuízos funcionais e hemodinâmicos do paciente e, finalmente, para se decidir uma categoria apropriada de tratamento (McLaughlin, Vallerie et al. 2009).

O cateterismo cardíaco direito é necessário para avaliar a gravidade da insuficiência hemodinâmica, para testar a vasoreatividade da circulação pulmonar e para um diagnóstico definitivo de HAP. Os seguintes parâmetros geralmente são avaliados: pressão do átrio direito (PAD); pressão arterial pulmonar (PAP) sistólica, diastólica e média; débito e índice cardíaco; resistência vascular pulmonar (RVP) e resistência vascular sistêmica (RVS); pressão arterial sistêmica; saturação de oxigênio no sangue arterial e venoso (Badesch, David et al. 2009). Embora o cateterismo tenha se tornado ao longo dos anos um procedimento relativamente seguro, é invasivo e pouco prático para executar em pacientes para o qual ele não está claramente indicado.

A ecocardiografia transtorácica é uma ferramenta que vem sendo utilizada para rastreamento de pacientes em risco de HAP, mesmo não sendo utilizada para confirmação definitiva da presença ou ausência da HAP. Com base numa avaliação ecocardiográfica, os pacientes que apresentam sinais sugestivos de HAP devem ser encaminhados para o cateterismo cardíaco direito (Habib e Torbicki, 2010). A HAP

severa frequentemente causa dilatação do átrio e ventrículo direito, modificação do septo interventricular, disfunção do ventrículo direito e dilatação das veias cavas, bem como das veias hepáticas (Bossone, Eduardo et al. 1999). Medições do diâmetro basal e da área do ventrículo direito no final da diástole têm sido reportadas como maiores nos indivíduos com HAP (Figura 1). Uma avaliação mais precisa pode ser obtida por medição dos diâmetros do ventrículo direito, na sístole e a diástole, permitindo o cálculo da fração de encurtamento do ventrículo direito (FECVD). A FECVD é um método relativamente simples de avaliar a função ventricular direita, se mostrando diminuída em pacientes com HAP (Lang, Roberto et al. 2006).

O avanço da HAP também pode causar compressão do ventrículo esquerdo, levando a um enchimento anormal e diminuindo o débito cardíaco. A compressão do ventrículo esquerdo pode ser medida através do índice de excentricidade (razão entre os diâmetros medidos nos eixos longitudinal e transversal, em sístole e diástole) e um enchimento diminuído através do fluxo da mitral. Utilizando-se da medida do fluxo aórtico e do diâmetro do anel aórtico pode-se estimar o débito cardíaco (Badano, Luigi et al. 2010; Raymond, Ronald et al. 2002).

Também algumas medidas utilizando a ecocardiografia doppler têm sido correlacionadas com o aumento da pressão arterial pulmonar. Entre elas, destaca-se o pico da velocidade de ejeção do ventrículo direito (tempo de aceleração), o qual se apresenta diminuído com o aumento da pressão arterial pulmonar (Kitabatake, Akira et al. 1983). A razão das velocidades máximas do pico E (enchimento lento do ventrículo direito) e pico A (enchimento tardio do ventrículo direito) medidas no fluxo da tricúspide se mostra menor em pacientes com hipertensão pulmonar (Yu, Cheuk-Man et al. 1996).

O cálculo do índice de Tei ou índice de performance do miocárdio para o ventrículo direito (IPMVD) pode ser calculado a partir do tempo de ejeção e do tempo de fechamento da tricúspide (Tei, Chuwa et al. 1996) (Figura 2). O índice de Tei tem a vantagem de ser relativamente independente das condições de carga e de representar uma estimativa global da função ventricular direita independente de suposições geométricas (Badano, Luigi et al. 2010). Outro parâmetro simples para avaliar a função do ventrículo direito é medindo-se a excursão sistólica no plano do anel da tricúspide (TAPSE) (Figura 3). O TAPSE é um bom parâmetro para

investigação da função ventricular direita, uma vez que fibras longitudinais são predominantes no ventrículo direito. Este parâmetro pode ser obtido facilmente pela ecocardiografia no modo M do anel do ventrículo direito. Os valores normais estão severamente reduzidos em caso de disfunção ventricular direita (Ueti, Osvaldo et al. 2002).

Dessa forma, a ecocardiografia continua a ser o método não-invasivo mais útil clinicamente que permite avaliação multidimensional da circulação pulmonar. A ecocardiografia tem um papel fundamental no diagnóstico da HAP através da identificação de pacientes para os quais o cateterismo do ventrículo direito é justificado, facilitando o diagnóstico precoce. O valor prognóstico de certos parâmetros ecocardiográficos também é reconhecido e a avaliação regular destes, como parte de uma abordagem orientada para se verificar o efeito da terapia, é fundamental para monitorar a progressão da HAP e a resposta dos pacientes ao tratamento específico (Habib e Torbicki, 2010).

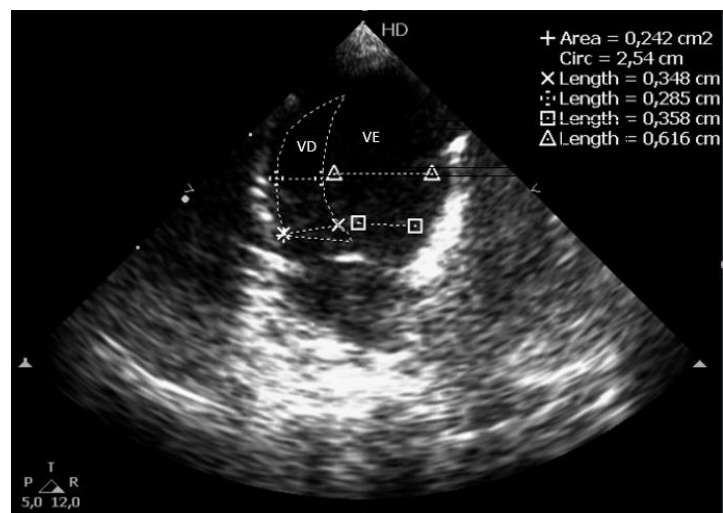


Figura 1: Visão apical quatro câmaras do coração de rato Wistar, realizada durante este trabalho. Medidas da área do ventrículo direito e dos diâmetros medial e basal dos ventrículos direito e esquerdo. VD = ventrículo direito; VE = ventrículo esquerdo.

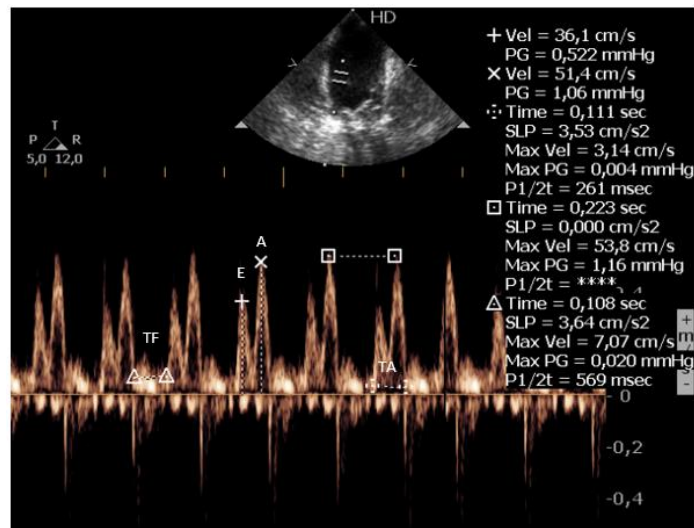


Figura 2: Medidas do fluxo pela tricúspide de rato Wistar, realizadas durante este trabalho. E = velocidade máxima do pico E (enchimento lento); A = velocidade máxima do pico A (enchimento rápido); TF = tempo de fechamento; TA = tempo de abertura.

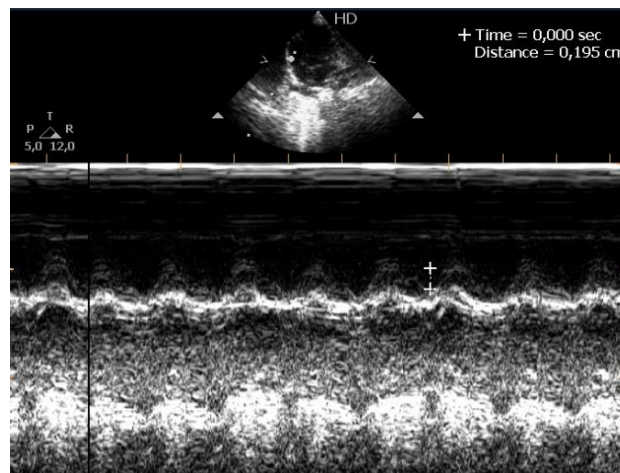


Figura 3: Medida de TAPSE de rato Wistar em modo M realizada durante este trabalho.

1.1.2 Epidemiologia

A estimada incidência da HAP varia regionalmente no mundo, se mostrando, por exemplo, de 15 casos por milhão em adultos na França a 25 casos por milhão em adultos na Escócia (Humbert, Marc et al. 2006; Peacock, Andrew et al. 2007). A exata prevalência da doença também é desconhecida, podendo ser largamente subestimada. Nos Estados Unidos, cerca de 200 mil hospitalizações anualmente tem a hipertensão pulmonar como causa primária ou secundária. Se estima uma prevalência na Europa de 0,3 – 6% (Mocumbi, Olga et al. 2015). Há hoje pelo menos 11 grandes estudos de registros de pacientes com HAP (Awdish e Cajigas 2015). O primeiro estudo, realizado de 1981 a 1985 pelo National Institutes of Health (NIH),

demonstrou uma idade média de diagnóstico de 36 ± 15 anos e média de sobrevivência de 2,8 anos para a HAP (Rich, Stuart et al. 1987). Estudos mais recentes, mostram médias de sobrevivência maiores, como um estudo retrospectivo realizado no Japão, em que os pacientes apresentaram média de sobrevivência de $14,9 \pm 0,8$ anos com taxas de sobrevivência em 1, 5 e 10 anos de 98%, 96% e 78% respectivamente. Essa melhora foi relacionada com uma maior taxa de prescrições de drogas para tratamento da HAP (Ogawa, Aiko et al. 2014). Também houve um aumento na idade média de diagnóstico, chegando a 65 ± 15 anos em estudos prospectivos como o COMPERA (Hoeper, Marius et al. 2013). Desfechos como declínio na distância percorrida no teste de 6 minutos de caminhada, maior risco de hospitalização, necessidade de transplante ou morte estão mais presentes em pacientes diagnosticados acima de 55 anos. Possivelmente isso ocorra devido ao maior avanço da doença com mudanças histopatológicas na vasculatura pulmonar que afetam a eficácia da terapia disponível (Kodur, Sreekanth et al. 2015). Mudanças na epidemiologia da hipertensão pulmonar podem ter sido influenciadas por fatores independentes da patologia em si, como modificações na sua classificação, maior precisão no diagnóstico e maior acesso aos tratamentos. Entre os pacientes, se observa um maior número de mulheres acometidas pela doença em comparação com homens, sendo a razão dessa preponderância ainda desconhecida (Humbert, Marc et al. 2006; McGoan, Michael et al. 2013). A apresentação clínica não parece ser diferente entre os sexos, porém, a idade média de diagnóstico da doença se mostra menor em mulheres. Uma vez estabelecido o quadro da doença, homens apresentam maior risco de mortalidade apesar do mesmo tratamento. Essa situação parece estar ligada à influência dos hormônios sexuais, em especial ao estrogênio, o qual pode favorecer o desenvolvimento da doença, mas também diminuir os desfechos desfavoráveis (Manes, Alessandra et al. 2012).

Há poucos estudos epidemiológicos da HAP no Brasil, sendo o mais completo e recente de 2014 (Alves, Jose Leonidas et al. 2014). Nesse trabalho, um estudo prospectivo de casos incidentes, em um total de 178 pacientes com HP entre 2008 e 2013, se observou uma média de idade de 46 anos no diagnóstico e uma razão mulheres/homens de 3,3:1. A HAP idiopática apareceu como a mais comum (28,7%), seguida da HAP causada por doença do tecido conectivo (25,8%) e esquistossomose (19,7%). É importante salientar a esquistossomose como uma das

principais causas associadas com a HAP, uma doenças comum em países em desenvolvimento e com precárias condições de saneamento básico. A estimativa de casos de esquistossomose no mundo é de 200 milhões de pessoas afetadas, principalmente nas áreas da África, América do Sul, Caribe, Oriente Médio e Ásia, levando a crer que essa doença é a principal causa sub-reconhecida da HAP (Mocumbi, Olga et al. 2015). Ainda no estudo brasileiro, viu-se que 66% dos pacientes usavam como terapia de primeira linha inibidor de fosfodiesterase tipo 5 (Sildenafil), enquanto 27% utilizavam antagonista de receptor de endotelina-1 (Bosentan). O acompanhamento do perfil epidemiológico da doença nas últimas décadas permite refletir sobre o progresso das terapias e o avanço dos diagnósticos, bem como reconhecer as características regionais das populações afetadas, o que contribui para a adaptação de diretrizes voltadas para determinados grupos de pacientes.

1.1.3 Patobiologia da HAP

As diferentes categorias da HAP (ver Tabela 1) diferem na sua causa, porém todas são caracterizadas por vasoconstrição pulmonar excessiva junto de um processo de remodelamento vascular anormal que usualmente afeta todas as camadas do vaso e resulta em severa perda de área de secção transversa. Como consequência, há um aumento da resistência vascular pulmonar que resulta em sobrecarga de pressão ao ventrículo direito. A complacência diminuída da artéria pulmonar também contribui para o aumento de trabalho e a distensão do ventrículo direito. Mudanças na túnica íntima incluem dano endotelial, proliferação de células endoteliais, invasão da íntima por células tipo miofibroblastos, aumento da deposição de matriz extracelular levando à fibrose e, muitas vezes, obstrução do lúmen vascular em decorrência das lesões plexiformes (Schermuly, Ralph et al. 2011). Uma outra característica bem proeminente presente na HAP é proliferação de células musculares lisas, as quais se estendem até pequenas artérias pulmonares não muscularizadas da região dos ácinos pulmonares (Humbert, Marc et al. 2004). Essas mudanças estruturais sugerem a mudança de um estado quiescente para um fenótipo proliferativo e resistente à apoptose na doença.

A produção de mediadores da vasodilatação, em especial a prostaglandina I₂, está diminuída na HAP, o que pode ser responsável por um aumento da produção de tromboxano A₂ e na consequente maior agregação plaquetária observada em alguns casos (Christman, Brian et al. 1992). Níveis diminuídos de óxido nítrico (potente molécula vasodilatadora e antiproliferativa) e cGMP (segundo mensageiro, *downstream* ao óxido nítrico) têm sido descritos na HAP, o que levou a testes do fármaco Sildenafil em pacientes no final da década de 90 e início dos anos 2000, hoje aprovado para o tratamento da HAP (Ghofrani, Hossein et al. 2006). Além disso, o substrato da síntese de NO pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), o aminoácido L-arginina, pode ser metilado endogenamente levando à formação da dimetil-arginina assimétrica ou simétrica. Ambas as formas têm papel na diminuição da formação de NO através da inibição da NOS (dimetil-arginina assimétrica) ou diminuição da captação de arginina (dimetil-arginina simétrica) e apresentam níveis plasmáticos e níveis no tecido pulmonar elevados em pacientes com HAP idiopática (Pullamsetti, Soni et al. 2005). Adicionalmente aos níveis reduzidos de mediadores da vasodilatação, se observa níveis aumentados dos vasoconstritores tromboxano e endotelina-1 (Christman, Brian et al. 1992). O tromboxano é tanto um agente vasoconstritor como pró-agregatório, facilitando a agregação plaquetária e a interação das plaquetas com o endotélio, levando à trombose da vasculatura pulmonar (Tournier, Agnes et al. 2010). Da mesma forma, a endotelina-1 atua não só aumentando o tônus vascular, mas também agindo de forma a promover um estímulo mitogênico ao atuar sobre os receptores ET_A e ET_B de células musculares lisas (Davie, Neil et al. 2002). Ainda é importante ressaltar o papel da 5-hidroxitriptamina (serotonina) na vasoconstrição, uma vez que estudos com pacientes com HAP idiopática e modelos experimentais de HAP mostram o aumento de produção de 5-HT por células endoteliais pulmonares, bem como sua maior atividade parácrina sobre células musculares lisas adjacentes (Launay, Jean-Marie et al. 2002). A manutenção do influxo de cálcio também gera a ativação da via Ca²⁺-calmodulina-dependente do ciclo celular com consequente efeitos mitogênicos sobre as células musculares lisas da vasculatura pulmonar, levando à hiperplasia (Burg, Elyssa et al. 2008).

Diversos fatores de crescimento estão implicados na HAP e no remodelamento vascular. Ao se ligarem e ativarem receptores tirosina-cinase da

superfície celular, esses fatores atuam como potentes mitogênicos para células vasculares, como células endoteliais, musculares lisas e miofibroblastos. A ativação desses receptores inicia uma cascata de sinalização intracelular resultando em proliferação e migração celular, bem como resistência à apoptose. Entre esses fatores encontra-se o TGF- β , o EGF e o PDGF, o qual se mostra aumentado no tecido pulmonar acometido pela HAP. Não é claro quais mecanismos levam à indução desses fatores de crescimento, embora espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas, uma vez que o peróxido de hidrogênio induz a expressão de PDGF em células endoteliais humanas, assim como a hipóxia e o estresse de cisalhamento (Humbert, Marc et al, 2004).

1.2 Modelo Animal para a HAP: Monocrotalina

O uso de modelos animais tem contribuído extensivamente para o atual entendimento da fisiopatologia e para a investigação de tratamentos experimentais na hipertensão pulmonar (Maarman, Gerald et al. 2013). Levanta-se por vezes preocupações com os modelos animais não apresentarem a completa severidade da hipertensão pulmonar observada em humanos em respeito a parâmetros histológicos e hemodinâmicos. Porém, a possibilidade de que a HP em humanos pode já estar em estágio avançado na progressão da doença quando da sua descoberta, torna essa comparação incorreta. Apesar dos modelos animais não recapitularem completamente a severidade da hipertensão pulmonar em humanos, eles podem ser muito bem correlacionados com formas mais suaves e moderadas da hipertensão pulmonar em humanos, um estágio que geralmente escapa no momento do diagnóstico (Maarman, Gerald et al. 2013).

A monocrotalina (MCT), um alcaloide derivado da planta *Crotalaria spectabilis*, é conhecida por sua habilidade de causar hepatotoxicidade e hipertensão pulmonar. Em geral, tem sido utilizada em ratos a dose de 60-80mg/kg administrada via subcutânea ou intraperitoneal (Gomez-Arroyo, Jose et al. 2012). A resposta à monocrotalina varia entre as espécies por conta das diferenças na farmacocinética da MCT envolvendo sua degradação e a formação hepática do seu derivado pirrólico ou excreção (Barman, Scott et al. 2009). A espécie preferida para o estudo da HAP induzida por MCT é atualmente o rato (Nogueira-Ferreira, Rita et al. 2015). Dentro

de uma semana, os ratos apresentam anorexia, apatia, incapacidade de ganhar peso e taquipnéia. À medida que a lesão pulmonar e o remodelamento vascular progridem, os ratos desenvolvem graus variáveis de dispnéia, fraqueza, diarreia e cianose periférica (Schoental e Head 1955). Menores espécies, tais como camundongo, além de ser mais difícil de se realizar ecocardiografia e cateterismo, raramente desenvolvem significativa HAP, têm menor grau de hipertrofia do VD e remodelamento arterial pulmonar (Ryan, John et al. 2013).

O mecanismo pelo qual a MCT causa HAP inclui o metabolismo da MCT no fígado pela enzima citocromo-P450 em derivados pirrólicos, em especial a dehidromonocrotalina, que iniciam um dano endotelial na vasculatura pulmonar (Shah, Mehul et al. 2005). Embora o mecanismo exato através do qual a MCT provoca HAP não ser conhecido, especula-se por muitos que o composto provoque lesão endotelial direta que, em seguida, aciona o inexorável desenvolvimento e progressão severa e eventualmente letal da HAP (Jasmin Jean-François et al. 2001). Outros investigadores sugerem que o aumento da pressão arterial pulmonar e o remodelamento vascular é precedido por um forte acúmulo de células inflamatórias mononucleares na camada adventícia de vasos intra-acinares (Wilson, Dennis et al. 1989).

Dentro de horas após a exposição do animal à monocrotalina, já se observa danos no endotélio vascular. Na primeira semana, pode-se perceber um aumento do dano endotelial, com presença de infiltrado inflamatório e edema. Na segunda semana já se observa o aumento da pressão arterial pulmonar (West e Hemnes 2011). O dano endotelial é o gatilho inicial para a vasculite pulmonar e o remodelamento pulmonar obstrutivo, caracterizado pelo estreitamento ou obliteração do lúmen vascular.

A histologia da vasculatura pulmonar nesse modelo mostra hiperplasia da íntima, hipertrofia da camada média e engrossamento da camada adventícia (Stenmark, Kurt et al. 2009). A HAP no modelo utilizando MCT é também caracterizada por aumento de apoptose das células endoteliais, proliferação de células musculares lisas da artéria pulmonar e resistência dessas células à apoptose (Shah, Mehul et al. 2005). Outros estudos realizados com o modelo de MCT também destacam o papel essencial de células inflamatórias (macrófagos, células dendríticas

e mastócitos) e citocinas (interleucinas 1 e 6) nos estágios iniciais do remodelamento vascular observado na HAP (Dahal, Bohla et al. 2011; Savai, Rajkumar et al. 2012). A MCT não apenas causa danos às artérias pulmonares mas também induz edema alveolar e fibrose intersticial pulmonar (Gomez-Arroyo, Jose et al. 2011). O modelo de MCT para estudo da HAP continua sendo utilizado com frequência, uma vez que ele oferece simplicidade técnica, reprodutibilidade e baixo custo quando comparado com outros modelos (Gomez-Arroyo, Jose et al. 2012).

1.3 Estresse Oxidativo na HAP

Além dos desequilíbrios entre vasodilatores e vasoconstritores já citados, temos a contribuição do estresse oxidativo (EO) na HAP. O papel patogênico das espécies reativas de oxigênio (EROs – como o superóxido, os radicais hidroxila, peroxila e hidroxiperoxila) e de nitrogênio (ERNs – como o óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, trióxido de nitrogênio e peróxido nitrito) na HAP foi recentemente revisado por Voelkel et al. 2012. Já é bem reconhecido que o EO contribui para o desenvolvimento e progressão de diversas doenças vasculares incluindo a modulação da inflamação na HAP, o metabolismo energético, a proliferação e diferenciação celular e a apoptose (Montani, David et al. 2014). O excesso de EROs surge em consequência de um desequilíbrio entre moléculas ou enzimas antioxidantes e oxidantes, levando à superprodução de EROs e ERNs, e pode resultar em dano celular e tecidual devido à oxidação de diversos constituintes celulares, como lipídios, carboidratos, proteínas e DNA.

Genes responsivos ao EO (como o da enzima tioredoxina) já mostraram um aumento de sua expressão no pulmão de indivíduos com HAP (Geraci, Mark et al. 2001). Além disso, os níveis de isoprostano, uma prostaglandina derivada da peroxidação de ácidos graxos essenciais, parecem estar elevados na urina de pacientes com HAP e se correlacionam com uma pior taxa de sobrevivência (Cracowski, Jean-Luc et al. 2012). Um dos principais radicais livres discutidos na HAP é o óxido nítrico (NO). De maneira geral, há um consenso que a sinalização desencadeada pelo NO na HAP está prejudicada (Tabima, Diana et al. 2012), mesmo que haja divergência entre estudos quando se analisa a atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Enquanto que alguns estudos demonstram o aumento da

atividade da eNOS, outros mostram sua redução (Xue e Johns, 1995; Giad e Saleh, 1995; Sharma, Shruti et al. 2008). Um dos possíveis mecanismos que explicam a sinalização do NO prejudicada é o desacoplamento da enzima eNOS, situação em que há formação de superóxido em detrimento do NO (Crabtree, Mark et al. 2009; Karuppiah, Kanchana et al. 2011). Também já demonstrou um decréscimo nos níveis de subunidades da proteína guanilato ciclase (com consequente menor geração de cGMP – responsável por ativar vias de sinalização que levam à vasodilatação e diminuição da agregação plaquetária como efeitos finais) e diminuição de sua atividade dependente de NO, levando a uma diminuição do relaxamento da vasculatura na HAP (Deruelle, Philippe et al. 2005). Não apenas a alteração na sinalização do NO, como também outros fatores relacionados com a produção de EROs levam à HAP. Há indícios de que maior produção de EROs, principalmente superóxido e peróxido de hidrogênio, possa estar aumentada na HAP em consequência de uma maior ativação das enzimas NADPH oxidases – as quais utilizam o NADPH como doador de elétrons para formação de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (DeMarco, Vincent et al. 2008; Nisbet, Rachel et al. 2010). Outra enzima, a xantina oxidoreductase, fisiologicamente responsável pela degradação das purinas, tende a se transformar em xantina oxidase sob condições principalmente inflamatórias, gerando $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Esta tem se mostrado aumentada nas artérias de pacientes com HAP (Spiekermann, Stephan et al. 2009). Ao se analisar o EO na HAP, não há como não se discutir a função mitocondrial. Uma pequena quantidade de O_2 não consegue ser reduzida à água e é convertida em $O_2^{\cdot-}$ na cadeia transportadora de elétrons (ETC), mesmo em situação fisiológica (Boveris e Chance, 1973). A conversão do superóxido em H_2O_2 na mitocôndria ocorre pela enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) e é importante uma vez que o H_2O_2 pode estimular diversas vias de sinalização e contribuir para regulação do tônus da vasculatura e modulação da proliferação celular e da apoptose (Tabima, Diana et al. 2012). Há duas formas distintas de abordar o papel da mitocôndria na HAP. A primeira seria uma disfunção na ETC mitocondrial levando à superprodução de EROs (devido a uma menor atividade de SOD2, por exemplo), promovendo senescência, necrose e apoptose, levando à vasculopatia (Wolin, Michael et al. 2005). A segunda teoria se baseia no fato de uma disfunção mitocondrial gerar uma troca do metabolismo oxidativo para a glicólise anaeróbica e levar a uma menor produção de EROs. Esse processo pode

ocasionar concomitantemente um acúmulo de equivalentes reduzidos de NADPH e FADH₂ e culminar com a diminuição do potencial redox celular, o que poderia, por exemplo, facilitar uma despolarização da célula e aumento do cálcio intracelular, levando à vasoconstrição das células musculares lisas na artéria pulmonar (Archer, Stephen et al. 2010). Diversos trabalhos também já mostraram os efeitos benéficos de terapias ou intervenções que têm as EROs e ERNs como alvos no estudo da HAP, como o uso de substâncias que evitam o desacoplamento de eNOS (Wunderlich, Carsten et al. 2008), superexpressão de SOD nas células endoteliais da vasculatura pulmonar (Nozik-Grayck, Eva et al. 2008) e inibidores da oxidação de ácidos graxos (Sutendra, Gopinath et al. 2003). Assim, novos ensaios visando a entender melhor a importância das EROs e ERNs e os efeitos da ruptura homeostática do EO na HAP precisam ser realizados, bem como a busca de novas terapias que possam atuar sobre esse quadro e melhorar o prognóstico e a sobrevida de pacientes com HAP.

1.4 Trepidil

O trapidil, uma triazolpirimidina, é utilizado atualmente no tratamento da cardiopatia isquêmica e para prevenção da reestenose pós-angioplastia coronariana, a qual acomete de 30 a 40% dos pacientes infartados (Bönisch, Detlef et al. 1998). As triazolpirimidinas, de forma geral, constituem uma importante classe de compostos orgânicos heterocíclicos associados com diversas propriedades biológicas e farmacológicas. Particularmente, o anel de pirimidina pode ser encontrado em uma grande classe de antibióticos nucleosídicos, antibactericidas, produtos químicos agrícolas e fármacos cardiovasculares (Said et al, 2009). As pirimidinas apresentam um grupo de compostos com atividade analgésica, anti-inflamatória, anti-arrítmica e anti-cancerosa (Amr, Abdel-Galil et al. 2003; Amr, Abdel-Galil et al. 2006; Amr, Abdel-Galil et al. 2007). O trapidil foi primeiramente sintetizado na década de 60, na Alemanha Oriental, entrando para o mercado a partir da década de 70. Seu mecanismo de ação clássico ocorre por inibição de fosfodiesterases, antagonizando o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e apresentando efeito vasodilatador (Salem, Neveen et al. 2010). Nos últimos anos, porém, diversos trabalhos têm demonstrado que as ações do fármaco

vão além dos já conhecidos alvos, criando a possibilidade de utilização do trapidil para a terapia de outras doenças (Salem, Neveen et al. 2010; Kim, Sun-Dom et al. 2013; Liu, MingJie et al. 2014).

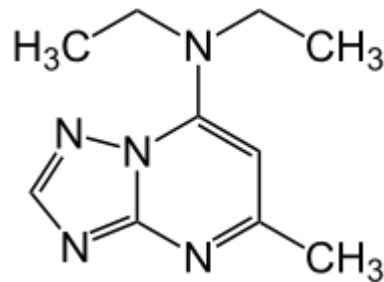


Figura 4: Estrutura química do trapidil (N,N-diethyl-5metil-[1,24]triazolo[1,5]pirimidina-7-amina) Fonte: PubChem (Open Chemical Database – NIH, National Center for Biotechnology Information)

O trapidil apresenta atividade antitrombótica ao inibir a atividade de fosfodiesterase de plaquetas bem como a síntese de tromboxano A₂, além de potencializar a ação de prostaciclina (PGI₂) (Suzuki, Yasuo et al. 1982; Block et al. 1983). Esse mecanismo é fundamental no caso de prevenção da reestenose e pode ser explorado para outras áreas, como, por exemplo, na hipertensão pulmonar, onde a ativação plaquetária pode levar à liberação do conteúdo de seus grânulos, os quais contêm PDGF. O PDGF é um forte mitogênico sobre as células musculares lisas da vasculatura (Bönisch, Detlef et al. 1998), podendo aumentar a resistência vascular e contribuir para o quadro da HAP. A atividade antimitogênica do trapidil parece não se dar exclusivamente sobre o antagonismo de receptores de PDGF, mas também pela direta ativação da proteína cinase A (PKA) e inibição da via Raf-1/MAPK, uma das cascatas de sinalização fundamentais para proliferação celular (Bönisch, Detlef et al. 1998; McGlynn, Liane et al. 2009). O PDGF também atua como agente quimiotático para fibroblastos, havendo redução da proliferação dessas células e melhora da microcirculação quando PDGF é inibido (Colak, Tahsin et al. 2003).

Há também estudos que mostram a capacidade do Trapidil em modular a resposta inflamatória, o que seria uma aplicação muito interessante, uma vez que na HAP temos a inflamação associada ao remodelamento vascular. O trapidil reduz a produção de IL-6 e IL-12 e a expressão de CD40 por monócitos, causando uma queda no número de células dendríticas competentes (Zhou, Ling et al. 1999; Colak,

Tahsin et al. 2003). Os níveis plasmáticos de IL-1 β e TNF- α também caem com o uso do fármaco, assim como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MPC-1), a qual também aparece diminuída na camada íntima e média da parede arterial de vasos lesionados na presença do trapidil (Salem, Neveen et al. 2010). Como é conhecido que a inflamação tem capacidade de modular os outros processos associados com a HAP, como a maior produção de algumas EROs, proliferação de células musculares lisas da vasculatura pulmonar e liberação de PDGF por plaquetas, o trapidil pode diretamente (como mencionado anteriormente) e indiretamente (controlando a inflamação) interferir com esses fatores.

Em relação ao EO, presente na HAP, o trapidil tem apresentado diversas formas de controlar esse desbalanço do estado redox celular. O trapidil levou a uma significativa redução nos níveis do ânion superóxido e na peroxidação de lipídios, ao passo que aumentou a atividade de SOD, catalase e glutathiona reduzida (GSH) em frações de tecido renal de ratos tratados com ciclosporina (Salem, Neveen et al. 2010). Além disso, o trapidil parece aumentar a concentração de NO no soro de ratos e induzir a atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Colak, Tahsin et al. 2003; Salem, Neveen et al. 2010). Esse mecanismo pode levar a uma diminuição da resistência vascular na artéria pulmonar, diminuindo a pós-carga e contribuindo para a melhora do quadro da HAP. Büyükafsar et al. 2001 reportaram que o trapidil, o qual tem efeito vasodilatador e liberador de NO, pode ter grande potencial para diminuir lesões teciduais, tendo diminuído a lesão glomerular em ratos submetidos à nefrotoxicidade. A liberação do ácido araquidônico livre, precursor das prostaglandinas e tromboxano A₂, ativa fosfolipase, levando a maior produção de prostanoídes, radicais livres e lipoperoxidação. Lipídios peroxidados inibem a produção de PGI₂ e aumentam formação de tromboxano A₂ (Colak, Tahsin et al. 2003). O trapidil reduz os índices de lipoperoxidação, medidos indiretamente pelos níveis de malondialdeído (Göçer, Alp et al. 2001; Colak, Tahsin et al. 2003).

São diversos os mecanismos pelos quais o trapidil age, inclusive suas diferentes ações se sobrepõem e se comunicam, levando a um efeito antitrombótico, antioxidante e anti-inflamatório. Desta forma, o trapidil parece ter grande potencial para o tratamento da HAP, uma vez que é capaz de modular todos os processos envolvidos na patogênese/fisiopatologia dessa doença.

2. HIPÓTESE

A administração do Trapidil contribui para uma melhora do remodelamento do ventrículo direito e retomada do equilíbrio redox celular em modelo de HAP induzida por monocrotalina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos do Trepidil no modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina, avaliando o estado redox e o remodelamento cardíaco.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do tratamento com Trepidil em ratos com hipertensão arterial pulmonar:

- * Por meio da análise do grau de hipertrofia ventricular direita com base nos parâmetros morfométricos.
- * Mediante análise dos parâmetros relacionados com a função cardíaca utilizando o registro de pressão ventricular direita.
- * Mediante análise dos parâmetros funcionais avaliados pela ecocardiografia.
- * Realizando a análise do estado redox celular: verificando a lipoperoxidação; mensurando a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e NADPH oxidases; verificando o conteúdo de sulfidrilas, peróxido de hidrogênio e analisando a razão GSH/glutathione totais.

4. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais de nosso estudo foram divididos em 2 momentos distintos, inicialmente realizando-se um estudo com a dose de Trapidil fixada em 5 mg/kg/dia (**Experimento 1**) e posteriormente novo estudo com a dose de Trapidil fixada em 8 mg/kg/dia (**Experimento 2**).

4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, idade se 5 semanas, pesando aproximadamente 100 gramas provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (33 x 17 x 40 cm), sendo quatro animais por caixa. Todos os animais foram mantidos sob condição padrão de biotério: ambiente com temperatura controlada (21°C), ciclo claro-escuro de 12 horas e umidade relativa do ar de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas “ad libitum”. O ganho de peso foi aferido diariamente.

4.1.1 Dimensionamento Amostral

O cálculo do tamanho amostral foi efetuado utilizando-se o software G*Power 3.1.9.2 (Schleswig-Holstein, Alemanha). No cálculo do tamanho da amostra foram considerados probabilidade de erro $\alpha = 0,05$, poder do teste estatístico = 0,80 e tamanho de efeito = 0,15. O n calculado foi de 80 amostras no total. Como se sabe, de acordo com a literatura, que entre os animais tratados com MCT a taxa de mortalidade varia em torno de 25%, foram acrescentados 5 animais aos grupos MCT e MCT+TRAP, totalizando 90 animais nos 4 grupos.

4.1.2 Considerações Éticas

O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e os experimentos só tiveram início após sua aprovação. Todos os procedimentos desse estudo estão de acordo com a Lei 11.794 e as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do CONCEA. O número do projeto aprovado pelo CEUA da Universidade é 28515.

4.2 Grupos Experimentais

Os grupos foram divididos em **Controle** – Animais que receberam apenas o veículo do Trapidil e da Monocrotalina; **Controle + Trapidil** – Animais que receberam o tratamento com Trapidil e apenas o veículo da Monocrotalina; **Monocrotalina** – Animais que receberam a Monocrotalina e apenas o veículo do Trapidil; **Monocrotalina + Trapidil** – Animais que receberam a Monocrotalina e o tratamento com o Trapidil.

4.2.1 Protocolo Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos. Foi induzida a hipertensão arterial pulmonar por injeção intraperitoneal de monocrotalina nos grupos Monocrotalina e Monocrotalina + Trapidil. Os grupos Controle e Controle + Trapidil receberam injeção composta com solução salina (0,9% NaCl). Após 7 dias e do estabelecimento da HAP iniciou-se o tratamento com o Trapidil, nos grupos Controle + Trapidil e Monocrotalina + Trapidil, e com veículo nos grupos Controle e Monocrotalina. O Trapidil foi administrado via intraperitoneal. Após 14 dias de protocolo, foram realizados o cateterismo do ventrículo direito e a ecocardiografia nos animais para avaliação de função cardíaca. Feito isso, foi realizado o procedimento de eutanásia dos animais.

Foram realizados dois experimentos em épocas distintas: **Experimento 1** (dose de Trapidil de 5 mg/kg/dia) e **Experimento 2** (dose de Trapidil de 8 mg/kg/dia).

4.2.2 Indução da HAP

Para a indução de hipertensão arterial pulmonar, os ratos dos grupos Monocrotalina e Monocrotalina + Trapidil receberam dose única intraperitoneal de 60 mg/kg de monocrotalina (Crotaline – C240 SIGMA) (SINGAL et al, 2000). Os ratos dos grupos Controle e Controle + Trapidil receberam dose única de solução salina intraperitoneal no mesmo volume.

4.2.3 Administração do Trapidil

Os animais dos grupos Controle + Trapidil e Monocrotalina + Trapidil receberam Trapidil (Sigma-Aldrich) via intraperitoneal 5 mg/kg diluído em salina (0,9% NaCl) uma vez ao dia a partir do dia 7 até o dia 14 (**Experimento 1**) ou 4

mg/kg diluído em salina duas vezes ao dia (totalizando 8 mg/kg/dia), do dia 7 até o dia 14 (**Experimento 2**) (Colak et al, 2003). Durante esse período, os animais Controle e Monocrotalina receberam veículo (0,9% NaCl) no mesmo volume aplicado nos animais dos grupos tratados.

4.3 Eutanásia dos Animais

Aos 14 dias de protocolo, foi realizado a ecocardiografia seguida do cateterismo do ventrículo direito dos animais para avaliação da função cardíaca após anestesiá-los com quetamina (90mg/kg, intraperitoneal, e volume de 0,45 mL para um rato de 250g) e xilazina (10mg/kg, intraperitoneal, e volume de 0,12 mL para um rato de 250g) simultaneamente (CREAL 2013). Posteriormente, os animais foram eutanasiados mediante decapitação em guilhotina manual, em ambiente isolado. Os animais sempre foram decapitados ainda sob efeito anestésico em ambiente apropriado, separado da sala de alojamento, com higienização completa de todo o material entre a morte de um animal e outro.

4.4 Análises Funcionais do Ventrículo Direito

4.4.1 Ecocardiografia

Para este procedimento, os animais foram anestesiados (quetamina 90mg/kg; xilazina 10mg/kg, intraperitoneal), submetidos à tricotomia da região torácica e colocados em posição decúbito lateral. As imagens foram obtidas através do modo bidimensional, modo-M e Doppler pulsátil (Philips HD7 Ultrasound System, Andover, MA, USA), com o uso de um transdutor S12-4 (Philips, Andover, MA, USA). Os seguintes parâmetros foram analisados: plano de excursão sistólica do anel da tricúspide (TAPSE), fração de encurtamento do ventrículo direito, índice de performance cardíaca do ventrículo direito, relação entre tempo de aceleração e o tempo de ejeção através da artéria pulmonar (TAC/TEJ) e razão entre o fluxo durante o esvaziamento rápido e lento do ventrículo direito (razões entre picos E/A). Também foram avaliados os diâmetros sistólico e diastólico do VD.

4.4.2 Registro de Pressão Ventricular Direita

Para este procedimento, os animais foram anestesiados (quetamina 90mg/kg; xilazina 10mg/kg, intraperitoneal), submetidos à tricotomia da região da jugular direita, e o campo cirúrgico desinfetado (álcool 70% iodado). A jugular foi dissecada

e isolada. O fluxo sanguíneo foi bloqueado através do uso de um ocluser metálico. Com o fluxo obstruído, rapidamente foi realizada uma incisão na parede superior do vaso, a fim de permitir a introdução de um cateter de polietileno PE-50 preenchido com solução salina (0,9% NaCl). O cateter foi inserido até o ventrículo direito e sua posição foi determinada pela observação da característica onda de pressão ventricular. Logo após este registro inicial, seguido de 5 minutos de estabilização, a pressão ventricular sistólica direita e a pressão diastólica final do ventrículo direito foram registradas. Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (Windaq-Data Acquisition System, PC) com taxa de amostragem de 1000 Hz, expressos em mmHg. A partir da derivação da onda de pressão ventricular direita e detecção de pontos máximos e mínimos a cada ciclo cardíaco, foram obtidos os valores da derivada de contração (dP/dt_{max}) e da derivada de relaxamento (dP/dt_{min}), respectivamente, sendo esses expressos em mmHg/s.

4.5 Análises Morfométricas do Ventrículo Direito, Pulmões e Fígado

Após eutanásia, o tórax dos animais foi aberto, o coração rapidamente retirado e colocado em solução de KCl 1,15% sobre o gelo. Com o auxílio de uma tesoura, os átrios foram separados e descartados, enquanto os ventrículos foram pesados. O ventrículo direito foi separado do ventrículo esquerdo + septo para avaliação da hipertrofia ventricular direita. A hipertrofia ventricular direita foi avaliada posteriormente pelas seguintes relações: massa ventricular direita/massa corporal, massa ventricular direita/comprimento da tíbia, massa ventricular direita/massa ventricular esquerda.

O fígado e os pulmões também foram retirados, pesados e colocados em estufa (60°C). Esses órgãos foram pesados diariamente, até não apresentarem mais redução de seu peso. Esse método descrito como peso úmido/peso seco foi utilizado para análise da congestão hepática e pulmonar (Singal, Khaper et al, 2000).

4.6 Preparação dos Homogeneizados e Análises do Estado Redox do VD

Os corações foram imediatamente armazenados em nitrogênio líquido após retirada e estocados em freezer (- 80°C) até análises. A homogeneização do VD foi realizada por 40 segundos com Ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 ml/g de

tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF) na concentração de 100 mmol/L. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 10000 g a 4°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer (- 80°C) para posteriores análises do estado redox.

4.6.1. Determinação da Peroxidação de Lipídios

A lipoperoxidação foi avaliada pelo método da produção de quimioluminescência (QL) iniciada por adição de hidróxido de tert-butil (TBOOH). A QL é em grande parte produzida pelas carbonilas excitadas e oxigênio singlet da amostra, que foram formados na reação radicalar. A QL foi medida em contador de cintilação (LKB rack beta liquid scintillation spectrometer 1215) operando como luminômetro e com fototubos sensíveis a emissões na faixa 380-620 nm (Llesuy et al, 1990). Inicialmente, foi medida a QL de um vial contendo 50 uL de homogeneizado de VD na presença de 2 mL de tampão fosfato 20mM/140 mM KCl (QL basal). Em seguida, adicionou-se 15 uL de TBOOH 400 mM ao vial e anotou-se o máximo valor de QL. O valor final foi expresso como a diferença entre a QL máxima e a QL basal, corrigindo-se pela proteína de cada amostra e expresso em contagens por segundo por miligrama de proteína (cps/mg proteína).

4.6.2. Determinação do Conteúdo de Sulfidrilas

O conteúdo de sulfidrilas, que representa uma defesa antioxidante não enzimática, está inversamente correlacionado com o dano oxidativo a proteínas. Para o ensaio de sulfidrilas, foram adicionados 0,1 mM de DTNB a 15 uL de homogeneizados de VD, que foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente num ambiente escuro, tal como descrito por Aksenov e Markesberry (2001). A absorvância (medição da formação do TNB) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido) e os resultados são expressos como nanomoles de TNB por miligrama de proteína (nmol/mg proteína).

4.6.3. Atividade da Catalase

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. Sendo assim, sua atividade pode ser medida através da avaliação do consumo do H₂O₂. Este teste consiste em avaliar a diminuição da

absorbância no comprimento de onda de 240 nm, que é onde ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a realização deste ensaio foram utilizados uma solução tampão fosfato a 50 mM (pH=7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 M. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 µL do tampão fosfato e 10 µL de amostra. A cubeta foi colocada no espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 µL do H₂O₂ 0,3 M e feito o monitoramento da diminuição da absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de H₂O₂ por minuto por miligramas de proteína (nmol/min/mg proteína) (Boveris e Chance, 1973).

4.6.4. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica utilizada para determinação da SOD baseia-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O radical superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (Marklund, 1985). Para esse ensaio, se utilizou 10 µl de homogeneizado de VD na presença de tampão Tris Base 50 mM e EDTA 1mM, adicionando-se 4 µl de Catalase 30 µM (Sigma Aldrich, Catalase from bovine liver - aqueous suspension, 10,000-40,000 units) e 8 µl de pirogalol 24 mM (Sigma Aldrich, Pyrogallol, ≥98% (HPLC), P.M 126,11). Os resultados obtidos foram expressos em U SOD/mg proteína comparando-se com uma curva padrão de SOD (Sigma Aldrich, Superoxide Dismutase from bovine, lyophilized powder, ≥1500 units/mg protein).

4.6.5. Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A enzima GPx catalisa a reação de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos com glutathione reduzida (GSH), formando glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Fisiologicamente, a GPx atua em conjunto com a enzima glutathione reductase (GR), a qual catalisa a redução da glutathione oxidada, usando NADPH como cofator. A atividade da GPx pode ser monitorada pela taxa de oxidação do NADPH a 340 nm na presença de GSH e GR, utilizando-se azida (N₃Na) para inibição da enzima catalase e hidroperóxido de tert-butil como

iniciador. Para o ensaio, foram utilizados 25 µl de homogeneizado de VD na presença de 165 µl de tampão fosfato 143 mM EDTA 4 mM, adicionando-se 250 µl NADPH 0,24 mM (Sigma Aldrich, N1630 SIGMA), 5 µl de azida 25 mM (Sigma Aldrich, S8032 SIGMA), 25 µl de GSH 20 mM (Sigma Aldrich, G4251 SIGMA) e 5 µl de GR (Sigma Aldrich, 10 U/ml – G3664 SIGMA). A atividade da GPx foi expressa como nanomoles de NADPH por minuto por miligrama de proteína (nmol/min/mg proteína).

4.6.6. Atividade da NADPH Oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase foi determinada espectrofotometricamente observando-se o consumo de NADPH a 340 nm durante intervalo de 20 minutos (Wei Y et al, 2006). Para esse ensaio, foram utilizados 25 µl de homogeneizado de VD na presença de 925 µl de tampão fosfato de sódio 100 mM, adicionando-se 50 µl de NADPH 1 mg/mL (Sigma Aldrich, N1630 SIGMA). Os resultados foram expressos como nanomoles de NADPH por minuto por miligrama de proteína (nmol/min/mg proteína).

4.6.7. Glutationas Totais e Reduzidas

Para determinação das glutations, inicialmente uma porção de 25 – 30 mg de VD foi desproteïnizada e homogeneizada na presença de de ácido perclórico 2M/EDTA 2 mM. A amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante separado em dois microtubos diferentes: 50 µl aliqüotados para medição das glutations totais e 50 µl aliqüotados para medição das glutations oxidadas. No microtubo contendo o sobrenadante para medição das glutations oxidadas foram adicionados 10 µl de N-etilmaleimida 0,2 M. Após 1h, ajustou-se o pH de ambos os sobrenadantes com MOPS 0,3 M/KOH 2M até 7,0. Para o ensaio, em cubeta de quartzo, adicionou-se 87,5 µl de água destilada, 12,5 µl de amostra, 50 µl de DTNB 6 mM (Sigma Aldrich, D8130 SIGMA), 350 µl NADPH 0,25 mM (Sigma Aldrich, N1630 SIGMA) e 5 µl de GR (Sigma Aldrich, 10 U/ml – G3664 SIGMA). A concentração de glutations foi calculada medindo-se espectrofotometricamente o TNB formado a 412 nm e expressa como µmol de TNB por minuto por mg de tecido.

4.6.8. Dosagem da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete (HRPO), resultando em um produto que absorve a 610 nm. Fatias do tecido cardíaco foram incubadas por 60 min a 37°C em tampão fosfato 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). Após, os sobrenadantes foram coletados e incubados com solução de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e HRPO 8,5 U/mL. Após 5 min, adicionou-se NaOH 1mol/L e realizou-se a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em μ moles de H₂O₂ por miligrama de tecido (Pick e Keisari, 1980).

4.6.9. Quantificação de Proteínas

A concentração de proteínas nos homogeneizados de VD foi estimada pelo método de Lowry, usando solução de albumina bovina como padrão (LOWRY et al. 1951).

4.7 Análise da Expressão Proteica por *Western Blot*

Para o isolamento das proteínas, as amostras de tecido foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100mM, EDTA 5mM, pH=7,4) e homogeneizadas com a utilização do homogeneizador OMNI (Tissue Homogeneizer, OMNI International, USA) em dois pulsos de 15 segundos com intervalos de 10 segundos. Foram adicionados ao tampão aprotinina (10·g/ml) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (20 μ M), para prevenir degeneração protéica. As concentrações de proteína foram analisadas e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína carregada nos géis (LOWRY et al, 1951).

Foram expostas 50 μ g de proteína à eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 6% (para separação do receptor de rianodina – RYR), 8% (para separação da SERCA) ou 12% (para separação da p-Fosfolambam e Fosfolamabam) (P/V) de gel separador e 5% (P/V) de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membrana usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20mM, glicina 150mM, metanol 20% (V/V), SDS 0,02% (P/V) (pH=8,3) em uma cuba de transferência resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas

foram bloqueados através de 1 hora de incubação com solução bloqueadora (5% (P/V) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (P/V), tween-20. As membranas foram processadas por imunodeteção usando os seguintes anticorpos primários: anti-SERCA, anti-p-Fosfolambam, anti-Fosfolambam e anti-RYR (Santa Cruz Biotechnology). Os anticorpos primários foram detectados usando o seguinte anticorpo secundário: “goat anti-rabbit horseradish peroxidase” e as membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram quantitativamente analisados no densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados em referência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana foram normalizados pelo método de Ponceau (KLEIN et al. 1995).

4.8 Estatística

Foram calculados as médias e os desvios padrões da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade da amostra (Shapiro-Wilk). Uma vez constatado que os dados são paramétricos, a comparação foi feita através de uma ANOVA de duas vias, complementada com o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $p < 0,05$. O software GraphPad InStat foi utilizado como ferramenta para análise dos dados.

5. RESULTADOS

Serão disponibilizados na versão completa desta dissertação.

6. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

Será disponibilizada na versão completa desta dissertação.

7. PERSPECTIVAS

Nesse trabalho avaliamos o efeito do Trapidil (5 e 8 mg/kg/dia) sobre o modelo de HAP induzida por monocrotalina aos 14 dias e observamos resultados que indicam uma melhora do remodelamento cardíaco direito. Seria interessante verificar o efeito do fármaco em tempos mais longos de exposição à monocrotalina (21 e 28 dias), momentos de maior hipertrofia e perda funcional ventricular direita.

Uma análise do Trapidil sobre os pulmões, verificando o estado da vasculatura pulmonar, como o grau de muscularização arteriolar e de deposição de colágeno poderia nos indicar se os efeitos do fármaco foram além do ventrículo direito. Também gostaríamos de avaliar parâmetros inflamatórios nos pulmões e ventrículo direito, uma vez que a HAP apresenta forte resposta pró-inflamatória e o fármaco já se mostrou capaz de reduzir essa resposta em outros modelos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES J. L. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in the southern hemisphere: results from a registry of incident Brazilian cases. **Chest**, v. 147, n. 2, p. 495-501, fev. 2015.

AMR A. G. *et al.* Anticancer activities of some newly synthesized pyridine, pyrane, and pyrimidine derivatives. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 16, p. 5481-8, ago. 2006.

AMR A. G. *et al.* Synthesis and Reactions of Some Fused Oxazinone, Pyrimidinone, Thiopyrimidinone, and Triazinone Derivatives with a Thiophene Ring as Analgesic,

Anticonvulsant, and Antiparkinsonian Agents. **Monatshefte fur Chemie**, v. 134, n. 10, p. 1395-409, out. 2003.

AMR A. G.; SABRY N. M.; ABDULLA M. M. Synthesis, reactions, and anti-inflammatory activity of heterocyclic systems fused to a thiophene moiety using citrazinic acid as synthon. **Monatshefte fur Chemie**, v. 138, n. 7, p. 699-707, jul. 2007.

ARCHER S. L. *et al.* Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. **Circulation**, v. 121, n. 24, p. 2661-71, jun. 2010.

AWDISH R.; CAJIGAS H. Definition, epidemiology and registries of pulmonary hypertension. **Heart Fail Rev**, v. 21, n. 3, p. 223-8, mai. 2016.

BADANO L. *et al.* Right ventricle in pulmonary arterial hypertension: haemodynamics, structural changes, imaging, and proposal of a study protocol aimed to assess remodelling and treatment effects. **Eur J Echocardiogr**, v. 11, n. 1, p. 27-37, jan. 2010.

BADESCH D.B. *et al.* Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 1, p. S55-66, jun. 2009.

BADESCH D.B. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL registry. **Chest**, v. 137, n. 2, p. 376-87, fev. 2010.

BARMAN S. A.; ZHU S.; WHITE R. E. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. **Vasc Health Risk Manag**, v. 5, p. 663-71, ago. 2009.

BARST R.J. *et al.* Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 1, p. S78-84, jun. 2009.

BARST, R. J. Hipertensão Pulmonar. In: GOLDMAN, L. Goldman Cecil Medicina. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 529-537.

BLOCK H. U. *et al.* The modification of the biosynthesis and effect of thromboxane A2 and prostacyclin by trapidil (Rocornal). **Biomed Biochim Acta**, v. 42, n. 2-3, p. 283-99, 1983.

BOISSIERE J. *et al.* Doppler tissue imaging in assessment of pulmonary hypertension-induced right ventricle dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 6, p. H2450-5, dez. 2005.

BÖNISCH D. *et al.* Antimitogenic effects of trapidil in coronary artery smooth muscle cells by direct activation of protein kinase A. **Mol Pharmacol**, v. 54, n. 2, p. 241-8, ago. 1998.

BOSSONE E. *et al.* Echocardiographic features of primary pulmonary hypertension. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 12, n. 8, p. 655-62, ago. 1999.

BOVERIS A.; CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p. 707-16, jul. 1973.

BURG E. D. *et al.* Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. S1, p. S99-111, mar. 2008.

BÜYÜKAFŞAR K. *et al.* Effect of trapidil, an antiplatelet and vasodilator agent on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacol Res**, v. 44, n. 4, p. 321-8, out. 2001.

CHRISTMAN B. W. *et al.* An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 327, n. 2, p. 70-5, jul. 1992.

COLAK T. *et al.* Effects of trapidil on the healing of colonic anastomoses in an experimental rat model. **ANZ J Surg**, v. 73, n. 11, p. 916-21, nov. 2003.

COLOMBO R. *et al.* Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 91, n. 1, p. 38-44, jan. 2013.

COPPLE B. *et al.* Anticoagulants prevent monocrotaline-induced hepatic parenchymal cell injury but not endothelial cell injury in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 180, n. 3, p. 186-96, mai. 2002.

CRABTREE M. J. *et al.* Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet-regulated GTP cyclohydrolase I expression. **J Biol Chem**, v. 284, n. 2, p.1136-44, jan. 2009.

CRACOWSKI J. L. *et al.* Independent association of urinary F2-isoprostanes with survival in pulmonary arterial hypertension. **Chest**, v. 142, n. 4, p. 869-76, out. 2012.

CUI B. *et al.* CPU0213, a non-selective ETA/ETB receptor antagonist, improves pulmonary arteriolar remodeling of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 2, p. 169-75, fev. 2009.

DAHAL B. K. *et al.* Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Respir Res**, v. 12, p.60, mai. 2011.

DAVIE N. *et al.* ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, n. 3, p. 398-405, fev. 2002.

DEMARCO V. G. *et al.* Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 294, n. 6, p. 2659-68, jun. 2008.

DERUELLE P.; GROVER T. R.; ABMAN S. H. Pulmonary vascular effects of nitric oxide-cGMP augmentation in a model of chronic pulmonary hypertension in fetal and neonatal sheep. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 289, n. 5, p. L798-806, nov. 2005.

ERTAN E. *et al.* The effect of trapidil and bevacizumab on tracheal anastomotic wound healing. **Curr Ther Res Clin Exp**, v. 75, p. 5-7, dez. 2013.

FAHRAMAND F.; HILL M. F.; SINGAL P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Mol Cell Biochem**, v. 260, n. 1-2, p. 21-9, mai. 2004.

GAINES S. P.; RUBIN L. J. Primary pulmonary hypertension. **Lancet**, v. 352, n. 9129, p. 719-25, ago. 1998.

GALDERISI M. Diastolic dysfunction and diastolic heart failure: diagnostic, prognostic and therapeutic aspects. **Cardiovasc Ultrasound**, v. 4, p. 3-9, abr. 2005.

GERACI M. W. *et al.* Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. **Circ Res**, v. 88, n. 6, p. 555-62, mar. 2001.

GHOFRANI H. A.; OSTERLOH I. H.; GRIMMINGER F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 8, p. 689-702, ago. 2006.

GIAID A.; SALEH D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 333, n. 4, p. 214-21, jul. 1995.

GÖÇER A. I. *et al.* Effects of trapidil on ATPase, lipid peroxidation, and correlation with ultrastructure in experimental spinal cord injury. **Neurosurg Ver**, v. 24, n. 2-3, p. 136-42, jul. 2001.

GOMEZ-ARROYO J. *et al.* A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 302, n. 10, p. L977-991, mai. 2012.

GOMEZ-ARROYO J. G. *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 302, n. 4, p. L363-9, fev. 2012.

HABIB G.; TORBICKI A. The role of echocardiography in the diagnosis and management of patients with pulmonary hypertension. **Eur Respir Rev**, v. 19, n. 118, p. 288-99, dez. 2010.

HADRI L. *et al.* Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 128, n. 5, p. 512-23, jul. 2013.

HARDZIYENKA M. *et al.* Right Ventricular Failure Following Chronic Pressure Overload Is Associated With Reduction in Left Ventricular Mass: Evidence for Atrophic Remodeling. **J Am Coll Cardiol**, v. 57, n. 8, p. 921-8, fev. 2011.

HARDZIYENKA M. *et al.* Sequence of Echocardiographic Changes During Development of Right Ventricular Failure in Rat. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 19, n. 10, p. 1272-9, out. 2006.

HOEPER M. M. *et al.* Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 24, n. 62, p. 42-50, dez. 2013.

HOEPER M. M. *et al.* Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. **Int J Cardiol**, v. 168, n. 2, p. 871-80, set. 2013.

HUANG Z. *et al.* Glycoprotein 130 Inhibitor Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. **Can J Cardiol**, no prelo, fev. 2016

HUMBERT M. *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 12, p. S13-24, jun. 2004.

HUMBERT M. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 173, n. 9, p. 1023-30, mai. 2006.

HUSAIN AN, KUMAR V. O Pulmão. In: Abbas AK, Kumar V, Fausto N. **Robbins & Cotran Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p. 747-812.

JASIŃSKA-STROSCHEIN M. *et al.* Rosuvastatin intensifies the beneficial effects of rho-kinase inhibitor in reversal of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Arch Med Sci**, v. 12, n. 4, p. 898-905, ago. 2016.

JASMIN J. F. *et al.* Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Circulation** v. 103, n. 2, p. 314-8, jan. 2001.

KAMEZAKI F. *et al.* Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 177, n. 2, p. 219-26, jan. 2008.

KARUPPIAH K. *et al.* Suppression of eNOS-derived superoxide by caveolin-1: a biopterin-dependent mechanism. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 3, p. H903-11, set. 2011.

KIM D. *et al.* Trapidil, a platelet-derived growth factor antagonist, inhibits osteoclastogenesis by down-regulating NFATc1 and suppresses bone loss in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 86, n. 6, p. 782-90, set. 2013.

KIMURA K. *et al.* Evaluation of right ventricle by speckle tracking and conventional echocardiography in rats with right ventricular heart failure. **Int Heart J**, v. 56, n. 3, p. 349-53, mai 2015.

KITABATAKE A. *et al.* Noninvasive evaluation of pulmonary hypertension by a pulsed Doppler technique. **Circulation**, v. 68, n. 2, p. 302-9, ago. 1983.

KLEIN D.; KERN R. M.; SOKOL R. Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochem Mol Biol Int**, v. 36, n. 1, p. 59-66, mai. 1995.

KODUR S. *et al.* Influence of Age on Outcome in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. **Heart Lung Circ**, v. 24, n. 7, p. 719-23, jul. 2015.

LANG R.M. *et al.* Recommendations for chamber quantification. **Eur J Echocardiogr**, v. 7, n. 2, p. 79-108, mar. 2006.

LAUNAY J. M. *et al.* Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. **Nat Med**, v. 8, n. 10, p. 1129-35, out. 2002.

LEHRMAN *et al.* Primary pulmonary hypertension and cor pulmonale. **Cardiol Rev**, v. 10, n. 5, p. 265-78, set. 2002.

LIU M. *et al.* Effect of trapidil in myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbit. **Indian J Pharmacol**, v. 46, n. 2, p. 207-10, mar. 2014.

LOWRY O. H. *et al.* Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAARMAN G. *et al.* A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? **Pulm Circ**, v. 3, n. 4, p. 739-56, dez. 2013.

MANES A. *et al.* Female gender and pulmonary arterial hypertension: a complex relationship. **G Ital Cardiol**, v. 13, n. 6, p. 448-60, jun. 2012.

MCGLYNN L. M. *et al.* Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 15, p. 1487-95, fev. 2009.

MCGOON M. D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 1, p. D51-9, dez. 2013.

MCLAUGHLIN V. V. *et al.* ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. **J Am Coll Cardiol**, v. 53, n. 17, p. 1573-619, abr. 2009.

MINGJIE L. *et al.* Effect of trapidil in myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbit. **Indian J Pharmacol**, v. 46, n. 2, p. 207-10, mar. 2014.

MOCUMBI A. O.; THIENEMANN F.; SLIWA K. A global perspective on the epidemiology of pulmonary hypertension. **Can J Cardiol**. v. 31, n. 4, p. 375-81. Abr. 2015.

MONTANI D. *et al.* Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. **Pharmacol Ther**, v. 141, n. 2, p. 172-91, fev. 2014.

MOON M. *et al.* Differential Calcium Handling in Two Canine Models of Right Ventricular Pressure Overload. **J Surg Res**, v. 178, n. 2, p. 554-562, dez. 2012.

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

MUSTAFA C. *et al.* Relationship between severity of pulmonary hypertension and coronary sinus diameter. **Rev Port Cardiol**, v. 34, n. 5, p. 329-35, mai. 2015.

NISBET R. E. *et al.* Rosiglitazone attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in a mouse model. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 42, n. 4, p. 482-90, abr. 2010.

NOGUEIRA-FERREIRA R. *et al.* Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 35, p. 8-16, dez. 2015.

NOZIK-GRAYCK E. *et al.* Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 295, n. 3, p. L422-30, set. 2008.

OGAWA A.; EJIRI K.; MATSUBARA H. Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan. **Life Sci**, v. 118, n. 2, p. 414-9, nov. 2014.

PEACOCK A. J. *et al.* An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J**, vol. 30, n. 1, p. 104-9, jul. 2007.

PENG Y. *et al.* Impact of N-Acetylcysteine on Neonatal Cardiomyocyte Ischemia-Reperfusion Injury. **Pediatric Research**, v. 70, p. 61-6, 2011.

PICK E.; KEISARI Y. A Simple Colorimetric Method for the Measurement of Hydrogen Peroxide Produced by Cells in Culture. **J Immunol Methods**, v.38, p. 161-70, 1980.

PULLAMSETTI S. *et al.* Increased levels and reduced catabolism of asymmetric and symmetric dimethylarginines in pulmonary hypertension. **FASEB J**, v. 19, n. 9, p. 1175-7, jul. 2015.

RAYMOND R. J. *et al.* Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 39, n. 7, p. 1214-9, abr. 2002.

REDOUT E. *et al.* Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 4, p. 770-81, set. 2007.

REDOUT E. *et al.* Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 298, n. 3, p. H1038-47, mar. 2010.

RICH S. *et al.* Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. **Ann Intern Med**, v. 107, n. 2, p. 216-23, ago. 1987.

RUITER G. *et al.* Reversibility of the monocrotaline pulmonary hypertension rat model. **Eur Respir J**, v. 42, n. 2, p. 553-6, ago.2013.

RYAN J.J.; MARSBOOM G.; ARCHER S. L. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. **Handb Exp Pharmacol**, v. 218, p. 105-49, 2013.

SAID S. A. *et al.* Analgesic, anticonvulsant and anti-inflammatory activities of some synthesized benzodiazepine, triazolopyrimidine and bis-imide derivatives. **Eur J Med Chem**, v. 44, n. 12, p. 4787-92, dez. 2009.

SALEM N. A. *et al.* Protective effect of trapidil and l-arginine against renal and hepatic toxicity induced by cyclosporine in rats. **Ren Fail**, v. 32, n. 8, p. 959-68, 2010.

SAVAI R. *et al.* Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 186, n. 9, p. 897-908, nov. 2012.

SCHERMULY R. T. *et al.* Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. **Nat Rev Cardiol**, v. 8, n. 8, p. 443-55, jun. 2011.

SCHOENTAL R.; HEAD M. A. Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. **Br J Cancer**, v. 9, n. 1, p. 229-37, mar. 1955.

SHAH M.; PATEL K.; SEHGAL P. B. Monocrotaline pyrrole-induced endothelial cell megalocytosis involves Golgi blockade mechanism. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 288, n. 4, p. C850-C862, abr. 2005.

SHARMA S. *et al.* Altered carnitine homeostasis is associated with decreased mitochondrial function and altered nitric oxide signaling in lambs with pulmonary hypertension. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 294, n. 1, p. L46-56, jan. 2008.

SICHELSCHMIDT O. *et al.* Trapidil protects ischemic hearts from reperfusion injury by stimulating PKAII activity. **Cardiovasc Res**, v. 58, n. 3, p. 602-10, jun. 2003.

SIMONNEAU G. *et al.* Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 24, n. 62, p. 34-41, dez. 2013.

SOUZA-RABBO M. *et al.* Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 35, n. 8, p. 944-8, ago. 2008.

SPIEKERMANN S.; SCHENK K.; HOEPER M. M. Increased xanthine oxidase activity in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J**, v. 34, n. 1, p. 276, jul. 2009.

STENMARK K. R. *et al.* Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 297, n. 6, p. L1013-32, dez. 2009.

SUTENDRA G. *et al.* Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 44, p. 44-58, ago. 2010.

SUZUKI Y. *et al.* Antithrombotic activity and the mechanism of action of trapidil (Rocornal). **Prostaglandins Leukot Med**, v. 9, n. 6, p. 685-95, dez. 1982.

TABIMA D. M.; FRIZZELL S.; Gladwin M. T. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 9, p. 1970-86, mai. 2012.

TAREK E. *et al.* The flavonoid monoHER prevents monocrotaline-induced hepatic sinusoidal injury in rats. **J Surg Oncol**, v. 106, n. 1, p. 72-8, jul. 2012.

TEI C. *et al.* Doppler echocardiographic index for assessment of global right ventricular function. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 9, n. 6, p. 838-47, nov. 1996.

TOURNIER A. *et al.* Calibrated automated thrombography demonstrates hypercoagulability in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Thromb Res**. v. 126, n. 6, p. 418-22, dez. 2010.

TZENG W. *et al.* The role of lipid peroxidation in menadione-mediated toxicity in cardiomyocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 27, n. 9, p. 1999-2008, set. 1995.

UETI O. M. *et al.* Assessment of right ventricular function with Doppler echocardiographic indices derived from tricuspid annular motion: comparison with radionuclide angiography. **Heart**, v. 88, n. 3, p. 244-8, set. 2002.

VANWINKLE B. *et al.* Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 28, n. 2, p. 119-34, 1994.

VOELKEL N. F. *et al.* Antioxidants for the treatment of patients with severe angioproliferative pulmonary hypertension? **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 14, p. 1810-7, mai. 2013.

VOELKEL N. F. *et al.* Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. **Eur Respir J**, v. 40, n. 6, p. 1555-65, dez. 2012.

WEST J.; HEMNES A. Experimental and transgenic models of pulmonary hypertension. **Compr Physiol**, v. 1, n. 2, p. 769-82, abr. 2011.

WILSON D. W. *et al.* Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. **Microvasc Res**, v. 38, n. 1, p. 57-80, jul. 1989.

WOLIN M. S.; AHMAD M.; GUPTE S.A. The sources of oxidative stress in the vessel wall. **Kidney Int**, v. 67, n. 5, p. 1659-61, mai. 2005.

WUNDERLICH C. *et al.* The adverse cardiopulmonary phenotype of caveolin-1 deficient mice is mediated by a dysfunctional endothelium. **J Mol Cell Cardiol**, v. 44, n. 5, p. 938-47, mai. 2008.

XUE C.; JOHNS R. A. Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **N Engl J Med**, v. 333, n. 24, p. 1642-4, dez. 1995.

YU C. M. *et al.* Right Ventricular Diastolic Dysfunction in Heart Failure. **Circulation**, v. 93, n. 8, p. 1509-14, abr. 1996.

YUKAKO O. *et al.* Liver congestion in heart failure contributes to inappropriately increased serum hepcidin despite anemia. **Tohoku J Exp Med**, v. 235, n. 1, p. 69-79, jan. 2015.

YUN W. *et al.* Protective effects of hydrogen-rich saline on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in a rat model. **Respir Res**, v. 4, p. 12-26, mar. 2011.

ZHOU L. *et al.* Inhibition of the CD40 pathway of monocyte activation by triazolopyrimidine. **Clin Immunol**, v. 93, n. 3, p. 232-8, dez. 1999.