



LUIZ EDUARDO DUARTE DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA – (1-7) NA FUNÇÃO CARDÍACA
DO VENTRÍCULO DIREITO E NO REMODELAMENTO
VASCULAR EM SUÍNOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR
INDUZIDA**

LAVRAS - MG

2017

LUIZ EDUARDO DUARTE DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA – (1-7) NA FUNÇÃO CARDÍACA DO VENTRÍCULO
DIREITO E NO REMODELAMENTO VASCULAR EM SUÍNOS COM HIPERTENSÃO
PULMONAR INDUZIDA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para a obtenção do título de mestre.

Orientadora

Profa. Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi

Co-orientador

Prof. Leonardo Augusto Lopes Muzzi

Co-orientador

Prof. Guilherme Oberlender

Lavras – MG
2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

de Oliveira, Luiz Eduardo Duarte.

Efeitos da Angiotensina - (1-7) na função cardíaca do
ventrículo direito e no remodelamento vascular em suínos com
hipertensão pulmonar induzida / Luiz Eduardo Duarte de Oliveira. -
2017.

50 p. : il.

Orientador(a): Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi.

Coorientador(a): Leonardo Augusto Lopes Muzzi, Guilherme
Oberlender.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Cardiologia Veterinária. 2. Sistema renina angiotensina. 3.
Modelo experimental porcino. I. Muzzi, Ruthnéa Aparecida Lázaro.

LUIZ EDUARDO DUARTE DE OLIVEIRA

**EFEITOS DA ANGIOTENSINA – (1-7) NA FUNÇÃO CARDÍACA DO VENTRÍCULO DIREITO
E NO REMODELAMENTO VASCULAR EM SUÍNOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR
INDUZIDA**

**EFFECTS OF ANGIOTENSIN - (1-7) IN THE VINTAGE RIGHT VENTRICULAR FUNCTION
AND VASCULAR REMODELING IN SWINE WITH INDUCED PULMONARY
HYPERTENSION**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, para a obtenção do título de mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2017.

Dr. Gabriel Domingos Carvalho	IFNMG – Campus Salinas
Dr. Antonio Carlos Cunha Lacrete Junior	UFLA
Dra. Giancarla Aparecida Botelho Santos	UFLA
Dra. Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi	Orientadora

Lavras – MG
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela possibilidade de concluir mais essa etapa e por despertar em mim o amor pela profissão.

À minha família pelo apoio, incentivo e amor incondicional. Em especial aos meus pais, Gracinha e Silvério, meu maior exemplo de fé, superação e humildade.

À Professora Ruthnéa Muzzi, pela colaboração no meu aprendizado, orientação, confiança e paciência nos últimos quatro anos.

Aos membros da banca, Professores Giancarla Santos, Gabriel Carvalho e Antonio Carlos Lacrete Jr, pela disposição para contribuir com esse estudo.

À colega Adriana Cristina Silva (*in memoriam*), pelos valiosos conselhos e pela participação essencial para desenvolvimento desse trabalho.

Aos Professores Leonardo Augusto Lopes Muzzi e Guilherme Oberlender pela co-orientação.

Ao Gustavo e à Naiara, por dividirem comigo meus melhores e piores momentos, por me incentivarem e extraírem sempre o melhor de mim.

Às colegas de mestrado, Claudine e Tatiana pelo carinho e cumplicidade desde o primeiro dia da residência. À Lorena e a Mari que chegaram mais tarde para completar essa equipe. Vocês tornaram meus dias melhores.

Aos residentes, estagiários, alunos de graduação e funcionários do Hospital Veterinário da UFLA, pelo carinho e pela troca de conhecimentos.

Aos amigos de Viçosa, por compreenderem minha ausência em tantos momentos importantes.

Às alunas do Programa de Iniciação Científica, que participaram ativamente desse trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de aprendizado.

A Universidade Federal de Lavras, pelo seu ensino de excelência.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro que possibilitou a realização do projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

*“As pessoas boas merecem nosso amor, as pessoas ruins
precisam dele”*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar é uma afecção complexa caracterizada pela disfunção endotelial e elevação da pressão na vasculatura pulmonar. Até o momento, não há cura para a afecção e o objetivo do tratamento é promover o alívio dos sintomas, aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. No entanto, a terapia convencional é insatisfatória sendo necessário o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. Estudos recentes têm proposto que a angiotensina-(1-7) exerça efeitos dilatadores sobre leitos vasculares e também diminua o remodelamento vascular, sendo estes potenciais fatores benéficos para o tratamento da hipertensão pulmonar. Este trabalho tem por objetivo estudar o potencial terapêutico da angiotensina (1-7) nos animais com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. O experimento foi realizado em 14 suínos, que aos 40 dias de vida foram avaliados por meio da eletrocardiografia, ecocardiografia, pressão arterial sistólica sistêmica e concentração sérica de peptídeo natriurético cerebral e óxido nítrico, em seguida receberam monocrotalina por via intravenosa induzindo a lesão. Posteriormente foram divididos em dois grupos (n=7). O primeiro grupo recebeu Angiotensina – (1-7) e o segundo placebo durante todo o estudo. Os animais foram submetidos a exame físico diário nas baias e os exames complementares foram repetidos mensalmente. Ao final de 60 dias foram eutanasiados e tiveram fragmentos do coração e pulmões coletados para análise histopatológica. O grupo placebo apresentou alterações eletrocardiográficas (aumento da amplitude da onda T, no intervalo QT e eixo cardíaco deslocado para a esquerda) e maiores valores de pressão arterial sistólica aos 60 dias (GP $97,57 \pm 13,36$ e GT $87,14 \pm 10,45$). Na ecocardiografia convencional observou-se alteração nos índices relação artéria pulmonar/aorta, índice de performance miocárdica e tempo sistólico ventricular direito em ambos os grupos, sendo de menor gravidade no grupo tratado. Na modalidade *Feature tracking* bidimensional foi observada redução da taxa de deformação miocárdica ventricular direita no grupo placebo (St global: GP $17,37 \pm 2,87$ e GT $23,71 \pm 7,87$ – p= 0,0342; StR global: GP $1,47 \pm 0,28$ e GT $2,02 \pm 0,69$ – p= 0,0364). A concentração de peptídeo natriurético cerebral não diferiu entre os grupos. A concentração de óxido nítrico foi significativamente maior no grupo tratado aos 30 e 60 dias. A avaliação histopatológica evidenciou lesões cardíacas e pulmonares menos acentuadas no grupo tratado. Os dados obtidos demonstram a ação benéfica da Angiotensina – 1-7 em pacientes com hipertensão pulmonar sendo eficiente no controle da disfunção cardíaca e no remodelamento vascular.

Palavras-chave: Cardiologia, feature-tracking, pneumologia, pulmão, sistema cardiovascular.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension is a complex condition characterized by endothelial dysfunction and elevated pressure in the pulmonary vasculature. To date, there is no cure for the condition and the goal of treatment is to promote relief of symptoms, increase survival, and improve patients' quality of life. However, conventional therapy is unsatisfactory and the development of new therapeutic methods is necessary. Recent studies have proposed that angiotensin- (1-7) exert dilating effects on vascular beds and also decrease vascular remodeling, being these potential beneficial factors for the treatment of pulmonary hypertension. This study aims to study the therapeutic potential of angiotensin (1-7) in animals with monocrotalin-induced pulmonary hypertension. The experiment was carried out on 14 pigs. At 40 days of age, the animals were evaluated by means of electrocardiography, echocardiography, systemic systolic blood pressure and serum concentration, brain natriuretic peptide and nitric oxide, and then received monocrotaline intravenously inducing the lesion. Subsequently, they were divided into two groups (n = 7). The first group received Angiotensin - (1-7) and the second placebo throughout the study. The animals were submitted to daily physical examination in the bays and the complementary exams were repeated monthly. At the end of 60 days they were euthanized and had fragments of the heart and lungs collected for histopathological analysis. The placebo group had electrocardiographic changes (increased T-wave amplitude, QT interval and left-sided cardiac axis) and higher systolic blood pressure at 60 days (GP 97.57 ± 13.36 and GT 87.14 ± 10.45). In the conventional echocardiography, changes in the pulmonary artery / aorta ratio, myocardial performance index, and right ventricular systolic time were observed in both groups, being of lower severity in the treated group. In the two-dimensional Feature tracking mode, the reduction in the rate of right ventricular myocardial deformation in the placebo group was observed (St global: GP 17.37 ± 2.87 and GT 23.71 ± 7.87 – p= 0,0342; overall StR: GP $1.47 \pm 0,28$ and GT 2.02 ± 0.69 – p=0,0364). Cerebral natriuretic peptide concentration did not differ between groups. The concentration of nitric oxide was significantly higher in the group treated at 30 and 60 days. The histopathological evaluation showed less pronounced cardiac and pulmonary lesions in the treated group. The data obtained demonstrate the beneficial action of Angiotensin - 1-7 in patients with pulmonary hypertension being efficient in the control of cardiac dysfunction and vascular remodeling.

Keywords: Cardiology, cardiovascular system, feature-tracking, lung, pulmonology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Exame ecocardiográfico de um suíno saudável. Modo bidimensional, corte parasternal direito transversal ao nível dos vasos da base, demonstrando as medidas para a obtenção do índice AP:Ao. A = diâmetro da aorta, B = diâmetro da artéria pulmonar.....	16
Figura 2	Figura esquemática do Doppler de onda pulsada, registros de tricúspide e pulmonar demonstrando o cálculo do índice de performance miocárdica.....	17
Figura 3	Intervalos de tempo sistólico ventricular direito obtidos a partir da velocidade de saída do ventrículo direito em um cão com hipertensão pulmonar venosa.....	18
Figura 4	Figura esquemática simplificada do sistema renina-angiotensina.....	21

SEGUNDA PARTE

Figura 1	Hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em suínos. A: concentração sérica de peptídeo natriurético cerebral (BNP). B: concentração sérica de óxido nítrico (NO)	43
Figura 2	Hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em suínos. A: suíno sem alteração vascular. B: Suíno 4 do grupo placebo apresentando acentuado remodelamento. C: suíno 1 do grupo tratado com moderado remodelamento vascular H.E. Obj. 20x	44

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Tabela 1	Valores referentes a ecocardiografia convencional de suínos com HAP tratados e não tratados com Ang – (1-7) após indução por monocrotalina	41
Tabela 2	Valores referentes a <i>Strain</i> longitudinal e <i>Strain rate</i> longitudinal do ventrículo direito de suínos com HAP tratados e não tratados com Ang – (1-7)	42
Tabela 3	Variabilidade interobservador analisadas em 60% dos suínos (n=8) com Hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina selecionados aleatoriamente	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ao	Aorta
AP	Artéria pulmonar
AT1R	Receptores de angiotensina II tipo 1
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
bpm	Batimentos por minuto
CES	Centro experimental de suínos
CI	Correlação interclasse
DP	Desvio padrão
ECA-2	Enzima conversora da angiotensina 2
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ET-1	Endotelina 1
<i>FTI-2D</i>	<i>Feature tracking</i> bidimensional
GMPc	Monofosfato guanosina cíclico
GP	Grupo placebo
GT	Grupo tratado
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
HE	Hematoxilina Eosina
HP	Hipertensão pulmonar
IC	Intervalo de confiança
IPM	Índice de performance miocárdica
Kg	Quilograma
MCT	Monocrotalina
MCTP	Monocrotalina Pirrole
mm	Milímetro
NO	Óxido Nítrico
PCNA	Antígeno nuclear de células em proliferação

SRA	Sistema renina angiotensina
<i>St</i>	<i>Strain</i>
<i>StR</i>	<i>Strain rate</i>
TA	Tempo de aceleração
TE	Tempo de ejeção
UFLA	Universidade Federal de Lavras
VD	Ventrículo direito

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1.	Hipertensão Pulmonar.....	13
2.2.	Diagnóstico	15
2.3.	Tratamento	19
2.4.	Angiotensina (1-7)	20
2.5.	Suínos	22
2.6.	Monocrotalina	23
3.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	26
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

	RESUMO.....	35
1.	INTRODUÇÃO.....	36
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1.	Avaliação eletrocardiográfica.....	38
2.2.	Pressão arterial sistêmica.....	38
2.3.	Avaliação ecocardiográfica.....	39
2.4.	Concentração sérica de BNP e NO.....	39
2.5.	Avaliação anatomopatológica.....	40
2.6.	Análise estatística.....	40
3.	RESULTADOS.....	41
4.	DISCUSSÃO.....	45
5.	CONCLUSÃO.....	47
6.	AGRADECIMENTOS.....	48
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença complexa caracterizada por uma disfunção endotelial que resulta em remodelamento vascular e elevação da pressão arterial pulmonar, com consequente insuficiência cardíaca direita. A média de sobrevida de pacientes humanos não tratados é de 2,8 anos após o diagnóstico inicial e muitos indivíduos que apresentam HAP, nos estágios precoces, tendem a ser assintomáticos e apresentam sinais inespecíficos. Os tratamentos convencionais tem sido utilizados para melhorar a função pulmonar, mas nenhum deles tem sido eficaz no controle da enfermidade.

É necessário o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que possam ser eficazes para a sobrevida em longo prazo destes pacientes, prevenindo a progressão da doença. Como a angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)) tem sido relacionada a ações vasodilatadoras e na diminuição do remodelamento vascular postula-se que este fármaco tenha ação vasodilatadora e na diminuição do remodelamento vascular também no leito pulmonar, tornando-o uma boa alternativa para o tratamento clínico, tanto no homem como nos animais.

Dessa maneira, este trabalho tem por objetivo avaliar o potencial terapêutico da Ang-(1-7) em suínos com HAP induzida e estudar formas que permitam o diagnóstico precoce da afecção.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Hipertensão arterial pulmonar

A HAP é uma doença grave caracterizada pelo aumento da resistência na vasculatura pulmonar, resultando em disfunção ventricular direita, insuficiência cardiopulmonar e consequente morte do paciente (MCGOON et al., 2013; ZAGOLIN e LLANCAQUEO, 2015). Compreende um conjunto de doenças que têm achados patológicos comuns, porém apresentam diferenças fisiopatológicas e prognósticas. A HAP frequentemente resulta em *cor pulmonale* e sinais de insuficiência cardíaca congestiva direita (MINAI, 2010; SABELA, 2015; BANDEIRA e WAETGE 2015). Em humanos a afecção é hemodinamicamente definida por pressão média de

artéria pulmonar igual ou superior a 25mmHg (HOEPER et al., 2013; DIAS et al., 2015), assim como nos animais de companhia (BOON, 2011).

A etiologia subjacente da hipertensão pulmonar varia e, com frequência, múltiplos fatores são responsáveis (JARDIM, PRADA e SOUZA, 2015). Normalmente, o leito vascular pulmonar recebe o volume sanguíneo liberado pelo ventrículo direito. Este leito vascular apresenta uma baixa resistência ao fluxo sanguíneo aumentado por meio da dilatação dos vasos na circulação pulmonar. Entretanto, se o leito vascular pulmonar está obstruído, como na hipertensão pulmonar, a capacidade de receber qualquer fluxo ou volume do sangue fica prejudicada, e, então, o fluxo sanguíneo aumentado eleva a pressão do tronco da artéria pulmonar. À medida que a pressão da artéria pulmonar aumenta, também aumenta a resistência vascular pulmonar. A constrição da artéria pulmonar (como na hipoxemia ou hipercapnia) e a redução no leito vascular pulmonar (que ocorre com a embolia pulmonar) resultam em um aumento na resistência e pressão vasculares pulmonares, ou seja, um remodelamento cardiovascular para suportar o aumento da carga de trabalho imposta à musculatura cardíaca. Por fim, o miocárdio não consegue satisfazer as demandas crescentes impostas a ele, levando à hipertrofia (aumento e dilatação) e insuficiência ventricular direita (WEITZENBLUM et al., 1981).

A vasoconstrição pulmonar ocorre devido a disfunção das células endoteliais, que culmina com uma produção reduzida de vasodilatadores, tais como óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (associada a expressão diminuída das enzimas prostaciclina sintetase e óxido nítrico sintetase), e superprodução de vasoconstritores, tais como tromboxane A₂ e endotelina-1 (ET-1) (RUFINO et al., 2013; RAMOS, FERREIRA e ARAKAKI, 2015). Devido a isso, há o remodelamento vascular que ocorre por redução na expressão de vasodilatadores e a hiperexpressão de vasoconstritores (principalmente a endotelina, a qual é um fator de crescimento para as células musculares lisas) (RUNO e LOYD, 2003). Nos pacientes portadores de HAP também há um aumento na concentração plasmática da serotonina e uma redução no estoque plaquetário da mesma, a qual é um vasoconstritor pulmonar e promove proliferação de células musculares lisas. O uso de alguns fármacos que determinam aumento na liberação de serotonina das plaquetas, inibindo a recaptção, também pode levar a afecção (OLSCHEWSKI et al., 2001).

A HAP é uma síndrome considerada grave e complexa, caracterizada por sinais clínicos inespecíficos, com um diagnóstico de difícil realização, sendo muitas vezes tardio, o que culmina com prognósticos desfavoráveis (BRITISH, 2001). A maioria dos indivíduos que apresentam a

afecção tende a ser assintomática nos estágios iniciais. Os sinais clínicos comumente relatados em humanos incluem dispneia, dor no peito, síncope e palpitações (ZAGOLIN e LLANCAQUEO, 2015). Essa dificuldade em fornecer diagnóstico preciso e no momento correto faz com que frequentemente haja um atraso de aproximadamente três anos entre a ocorrência do primeiro sintoma e o diagnóstico (BRITISH, 2001).

De forma crônica, a dispneia é o principal sintoma, ocorrendo, a princípio, com esforço e, mais adiante, em repouso. A dor torácica subesternal também é comum, afetando 25 a 50% dos pacientes humanos (CHATTERJEE et al., 2002). Os outros sinais e sintomas observados no homem e nos animais incluem encurtamento gradual da respiração que pode piorar com exercícios, desconforto torácico, fadiga, anorexia, tosse persistente, cianose, síncope, efusão pleural, pericárdica e ascite (TORRES et al., 1997; CHATTERJEE et al., 2002; SAWAMURA et al., 2009).

2.2. Diagnóstico

Há vários métodos para avaliar a pressão na artéria pulmonar, como a cateterização cardíaca do lado direito, ecocardiografia, eletrocardiografia (HOEPER et al., 2013; DIAS et al., 2015) e cintilografia miocárdica (GUIMARÃES et al., 2005).

Uma avaliação diagnóstica completa inclui história, exame físico, exame radiográfico do tórax, provas de função pulmonar, eletrocardiograma (ECG), ecocardiograma, imageamento de ventilação de perfusão, cateterismo cardíaco e exames laboratoriais (dosagem do NO, ET-1, peptídeo natriurético cerebral, dentre outros). Em alguns casos, pode ser necessária uma biópsia pulmonar, realizada por toracoscopia, visando elaborar um diagnóstico definitivo (FILHO e CARRASCO, 2005; MARTINS, 2014). O cateterismo cardíaco do lado direito do coração revela a pressão arterial pulmonar elevada. A ecocardiografia é a ferramenta não invasiva de maior utilidade para o diagnóstico da HAP. É um método amplamente disponível e possibilita descartar ou confirmar afecções cardíacas concomitantes (HOEPER et al., 2013; MARTINS, 2014).

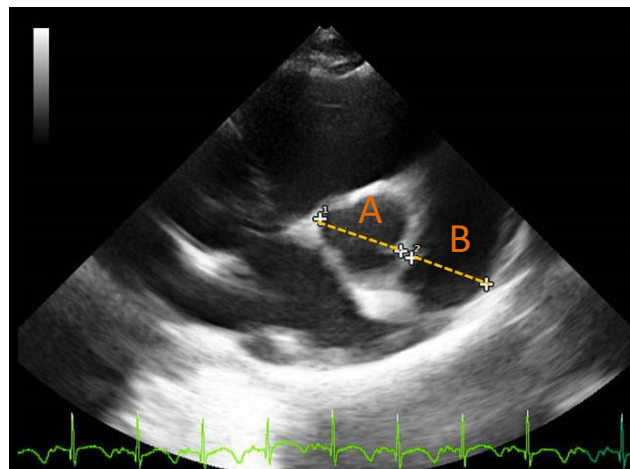
A HAP pode ser identificada no exame ecocardiográfico pela estimativa da pressão sistólica da artéria pulmonar, calculada a partir da velocidade de regurgitação tricúspide e da pressão de átrio direito. Por esse método é possível avaliar a progressão da doença e excluir outras condições com sinais e sintomas similares (BOON, 2011). O ECG sugere hipertrofia ventricular direita, desvio do eixo para a direita e ondas T altas, em pico, nas derivações

inferiores, ondas R anteriores altas e depressão do segmento ST e/ou inversão da onda T (FILHO e CARRASCO, 2005; MARTINS, 2014). O exame radiográfico de tórax é um método pouco sensível, que permanece normal, principalmente nos pacientes assintomáticos. Contudo, alguns achados podem ser sugestivos de hipertensão pulmonar como aumento no diâmetro dos ramos da artéria pulmonar, abaulamento do arco médio e radiolucência diminuída da vasculatura periférica. É também bastante útil para afastar diagnósticos secundários como doenças do parênquima pulmonar ou anormalidades do tórax. A oximetria de pulso pode revelar baixa perfusão de oxigênio sendo importante para o acompanhamento destes pacientes (FILHO e CARRASCO, 2005).

O ventrículo direito (VD) pode ser considerado um dos mais importantes preditores da evolução clínica em pacientes com doença cardiopulmonar (LA GERCHE e ROBERTS, 2015). A ecocardiografia é rotineiramente utilizada para avaliação de pacientes com HAP. Alguns índices como a relação Artéria pulmonar/Aorta (AP:Ao), o índice de performance miocárdica (IPM) do VD e, a relação entre o tempo de aceleração e tempo de ejeção (TA:TE) são indicados para avaliação de pacientes acometidos pela enfermidade (KELLIHAR e STEPIEN, 2015).

Foi demonstrada uma correlação positiva entre o grau de HAP e a dilatação da artéria pulmonar. Essa dilatação pode ser estimada por meio do índice AP:Ao (Fig.1). Entretanto, o teste demonstrou uma baixa sensibilidade, apenas 45% (DE MADRON et al., 2015). Em cães o valor de normalidade é de 0,8 a 1,15 (SERRES, CHETBOUL, GOUNI et al., 2007).

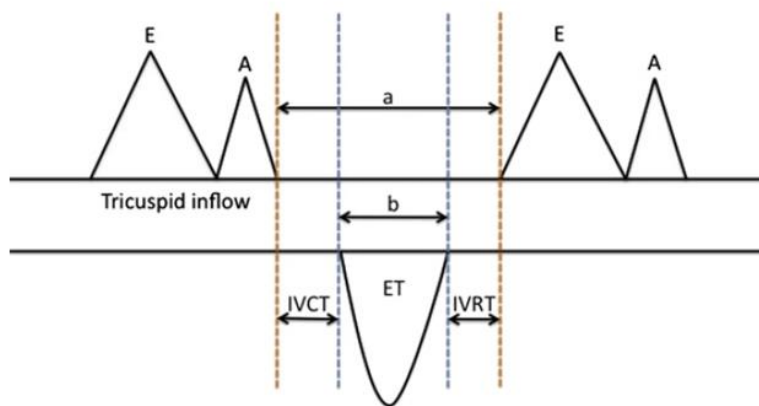
Figura 1 – Exame ecocardiográfico de um suíno saudável. Modo bidimensional, corte parasternal direito transversal ao nível dos vasos da base, demonstrando as medidas para a obtenção do índice AP:Ao. A = diâmetro da aorta, B = diâmetro da artéria pulmonar.



Fonte: Setor de Cardiologia Veterinária UFLA (2016).

O IMP é um índice obtido por meio do Doppler pulsado que avalia a sístole e a diástole para determinar o desempenho miocárdico. O IMP do VD é igual à soma dos tempos de ejeção do VD e de relaxamento isovolumétrico divididos pelo tempo de ejeção (KELLIHAN e STEPIEN, 2012; BOON, 2011; CHETBOUL, 2015) (Fig. 2). Um aumento do IMP do VD fornece um potencial suporte para o diagnóstico da HAP. Em cães, um IMP superior a 0,25 (sensibilidade de 78%, especificidade de 80%) é favorável ao diagnóstico de HAP (KELLIHAN e STEPIEN, 2012).

Figura 2 – Figura esquemática do Doppler de onda pulsada, registros de tricúspide e pulmonar demonstrando o cálculo do índice de performance miocárdica. “a”= tempo entre um fluxo e outro de tricúspide, “b” = tempo de ejeção do ventrículo direito, E = velocidade de pico diastólico precoce; A = velocidade de pico durante a contração atrial, ET = tempo de ejeção, IVCT = tempo de contração isovolumétrica, IVRT = tempo de relaxamento isovolumétrico.

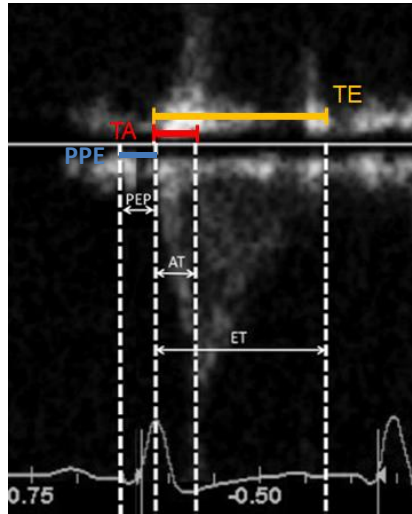


$$\text{IPM} = \frac{\text{IVCT} + \text{IVRT}}{\text{ET}} = \frac{\text{A} - \text{B}}{\text{B}}$$

Fonte: Adaptado de Kellihan e Stepien (2012).

Os intervalos de tempo sistólico ventricular direito tem sido utilizados para complementar o diagnóstico da HAP. São calculados por meio do Doppler pulsado na saída ventricular direita (Fig 3) e incluem: TA, TE, TA: TE, e período de pré-ejeção (PPE). Um índice TA: TE igual ou inferior a 0,31 (sensibilidade 73%, especificidade 87%) são consistentes com HAP.

Figura 3 – Intervalos de tempo sistólico ventricular direito obtidos a partir da velocidade de saída do ventrículo direito em um cão com hipertensão pulmonar venosa. PEP = período de pré-ejeção, TA = tempo de aceleração, TE = Tempo de ejeção.



Fonte: Adaptado de Kellihan e Stepien (2012).

Entretanto, a ecocardiografia convencional não inclui uma avaliação clara da função miocárdica (RAJAGOPAL et al., 2014). O *Feature Tracking (FTI-2D)* é um método sofisticado de avaliação da função miocárdica que fornece imagens de deformação de tecidos (taxa de deformação), possibilitando a avaliação da função miocárdica regional (LOCATELLI et al., 2016). Assim, é possível incorporar ao exame ecocardiográfico índices como o *strain (St)* e o *strain rate (StR)*. O *St* refere-se à magnitude de deformação da fibra miocárdica, cuja unidade é dada em %. e o *StR* consiste na velocidade que esta deformação acontece e sua unidade representada por $1/s$ ou s^{-1} (WESS, 2011).

A avaliação histológica da HAP é geralmente inespecífica nas fases iniciais. Stenmark et al (2009) relatam a ocorrência de hipertrofia da camada média da artéria pulmonar, espessamento da camada adventícia e o aparecimento de músculo nas paredes de artérias normalmente não-musculares. Na fase tardia o remodelamento vascular, a deposição de colágeno e a fibrose são achados frequentemente relatados (PIETRA et al., 2004; TUDER et al., 2007).

Para acompanhar o remodelamento vascular pulmonar na hipertensão pulmonar podem-se empregar técnicas de imunohistoquímica. Segundo Wrobel et al. (1996) para identificar as células que estão ativas dentro do ciclo celular pode-se utilizar o anticorpo monoclonal contra o antígeno nuclear de células em proliferação (anti-PCNA). O PCNA é uma proteína nuclear estável, regulada pelo ciclo celular, onde seu grau de síntese está diretamente relacionado com o grau de células em proliferação. O uso destes métodos mais sofisticados veio substituir a

contagem de células em mitose, uma vez que, dentro de uma população celular em proliferação, a fase de mitose (fase M) é a mais curta e tem o menor número de células entre as que estão em proliferação (LINDEN et al., 1992). O núcleo positivo para PCNA é observado durante todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0 (descanso), onde não ocorre marcação (WROBEL et al., 1996). Kuang et al., (2010), observou que o espessamento da parede dos vasos arteriais pulmonares na HAP ocorreu em parte pela proliferação das células do músculo liso das artérias pulmonares, marcadas na imunohistoquímica pelo anticorpo anti-PCNA.

2.3. Tratamento

As estratégias terapêuticas a serem adotadas para o tratamento da hipertensão pulmonar são bastante variadas em função dos diversos fatores etiológicos relacionados com o desenvolvimento da doença. Segundo Guimarães et al. (2005) e Subramanyam et al. (2010), a doença não tem cura, e o paciente necessita de tratamento por toda a vida. A diminuição da pressão pulmonar é a forma mais eficiente de promover o alívio dos sintomas de insuficiência cardíaca, aumentar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

De modo geral, os tratamentos são direcionados ao controle da disfunção ventricular direita resultante da presença da hipertensão pulmonar, além da estabilização de fatores que contribuem para a elevação desta pressão (ROSENBLUM, 2010; SUBRAMANYAM et al., 2010). O tratamento dos fenômenos associados corresponde a medidas gerais que visam evitar condições que levem ao agravamento da patologia já instalada. Esse tratamento convencional da HAP consiste na anticoagulação crônica, controle da disfunção ventricular direita, uso de oxigênio domiciliar e vasodilatadores (GUIMARÃES et al., 2005).

Três grupos de fármacos são regularmente empregados na terapia da hipertensão pulmonar, sendo eles: 1) Bloqueadores dos receptores de endotelina; 2) Inibidores da fosfodiesterase; 3) Análogos da prostaciclina. No entanto, a resposta dos pacientes a terapia ainda é insatisfatória sendo necessário o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos (ROMAN, LOPEZ-MESENGUER e DOMINGO, 2015; RAMOS, FERREIRA e ARAKAKI, 2015).

As observações anatomopatológicas de espessamento da túnica média das artérias pulmonares nos pacientes portadores de hipertensão pulmonar embasam a teoria de que a vasoconstrição é um dos mecanismos fisiopatológicos importantes nessa enfermidade. Dessa forma, o uso de agentes com ação vasodilatadora vem sendo estudado na tentativa de reverter

esse mecanismo (FALCÃO-PIRES et al., 2009; SAWAMURA et al., 2009; KUANG et al., 2010).

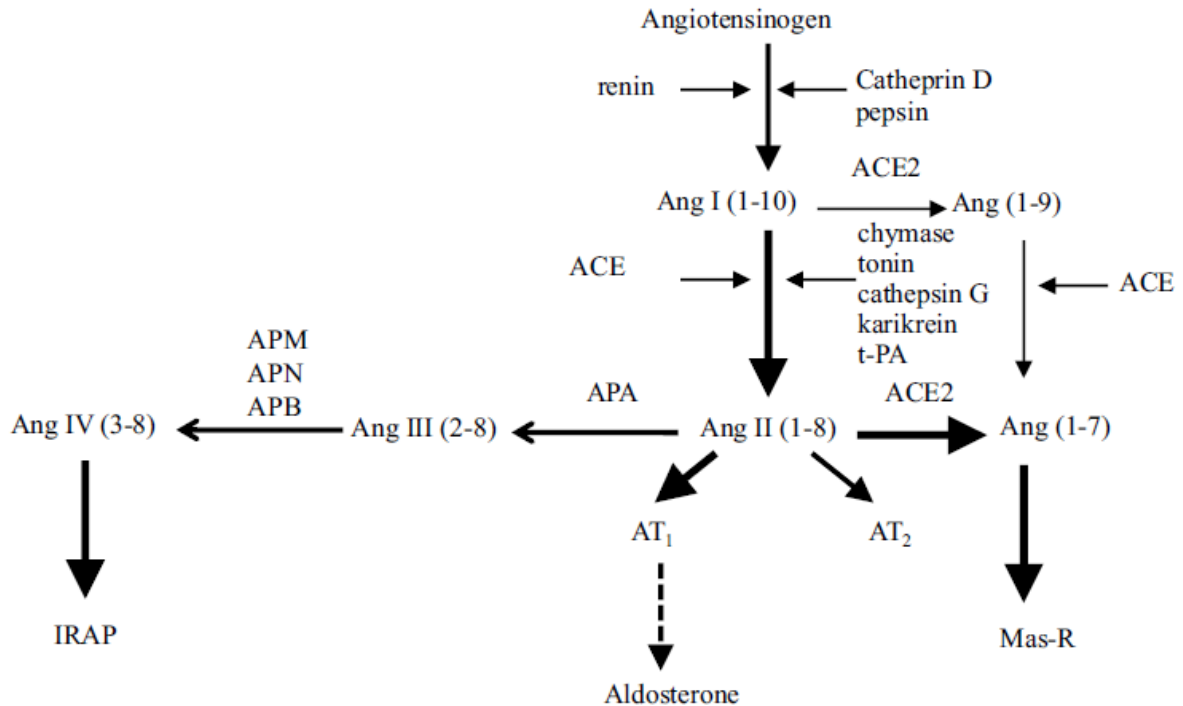
A eficácia de uma terapia vasodilatadora, no entanto, tem sido limitada pela ausência de seletividade e potência. A maioria dos fármacos considerados como vasodilatadores pulmonares possuem ação vasodilatadora sistêmica associada, assim com um efeito na circulação pulmonar pouco marcante. Desse modo, os benefícios aparentes podem ser secundários à diminuição da pré-carga, com diminuição do trabalho do ventrículo direito (ROSENBLUM, 2010). Estudos têm proposto que a angiotensina-(1-7) exerça efeitos dilatadores importantes sobre diversos leitos vasculares e coração (SHI et al., 2010; WANG et al., 2010, CHEN et al., 2011) e também diminua o remodelamento vascular, reduzindo a neoformação da túnica média do vaso e a síntese de colágeno (ZENG et al., 2009), sendo estes potenciais fatores benéficos para o tratamento da hipertensão pulmonar.

2.4. Angiotensina–(1-7), óxido nítrico e peptídeo natriurético cerebral

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel crucial na regulação cardiovascular (SANTOS et al, 2005). No final do século XX e início do século XXI houve uma grande mudança na visão clássica do sistema renina angiotensina (SRA), tornando-o muito mais complexo do que inicialmente previsto. Novas enzimas, peptídeos e receptores foram descobertos como a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), a Ang-(1-7) e os receptores Mas (SANTOS, 2014). Um dos aspectos novos para o potencial desenvolvimento de fármacos é a identificação da ECA2, que é um novo homólogo da ECA, que favorece a degradação da Angiotensina II (ang II) em Ang-(1-7) (FERREIRA et al., 2010).

A Ang–(1-7) é um peptídeo bioativo, produzido em uma via alternativa do SRA (ACUÑA et al., 2014) (Fig.4). Formada a partir da angiotensina I (Ang I) e Ang II por várias endopeptidases e carboxipeptidases, incluindo ECA2, a Ang-(1-7) exerce seus efeitos por meio da interação com os receptores Mas (SANTOS, 2005). A ativação do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas resulta em efeitos opostos aos do eixo ECA-AngII-AT1R, produzindo vários efeitos como vasodilatação e inibição do crescimento e proliferação celular (SANTOS et al., 2005). Assim, vários estudos têm sugerido que a ativação do eixo ECA2-Ang (1-7)-Mas impede e até reduz o dano observado em doenças cardiovasculares (FERREIRA et al., 2010).

Figura 4 – Figura esquemática simplificada do sistema renina-angiotensina. AMP = aminopeptidase; Ang = angiotensina; AT1= receptor de angiotensina do tipo 1; AT2 = receptor de angiotensina tipo 2; ECA = enzima conversora de angiotensina; IRAP = Aminopeptidase regulada por insulina; Mas-R = receptor Mas.



Fonte: Ohishi, Yamamoto e Rakug, 2013

Vários estudos demonstraram os efeitos da Ang – (1-7) sobre o coração. Averill et al (2003) foram os primeiros a reportar a presença desse peptídeo nos cardiomiócitos de ratos. Ferreira et al (2001), em seu estudo também inédito, reportaram o efeito cardioprotetor de Ang- (1-7), reduzindo significativamente a isquemia e as arritmias cardíacas induzidas por reperfusão em corações isolados de ratos.

Mais recentemente, a Ang- (1-7) e os receptores Mas foram identificados no nó sinoatrial de ratos, reforçando a ação do peptídeo sobre o ritmo cardíaco. Santos et al (2004) em seu estudo com ratos transgênicos relataram uma redução na duração das arritmias cardíacas de reperfusão nos animais com maior circulação do peptídeo.

Outro efeito atribuído a Ang – (1-7) é a inibição do remodelamento cardíaco que ocorre por meio da redução da deposição de colágeno no miocárdio, tornando a contratilidade miocárdica mais eficiente (PEI, MENG, LI et al., 2010; SANTOS, 2014).

Os vasos sanguíneos são um dos principais sítios de ação da Ang- (1-7), que é capaz de influenciar a hemodinâmica sistêmica e local. Seus principais efeitos incluem a redução da proliferação celular e a vasodilatação em diversos leitos vasculares, que resulta na redução da resistência vascular periférica com consequente aumento do débito cardíaco (SANTOS, 2005; SANTOS, 2014).

Wu et al, (2016) sugerem que a Ang-(1-7) estimula a liberação de NO em ratos após a microinjeção no núcleo solitário. Postula-se que a Ang-(1-7) tenha a mesma atuação no endotélio pulmonar, causando sua vasodilatação e diminuição do remodelamento vascular assim como demonstrado por Zeng et al. (2009) no miocárdio pós-infarto em coelhos e por Chen et al. (2011) em ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. Segundo Kuang et al. (2010) uma maneira de se quantificar o efeito benéfico de um tratamento na HP seria pela quantificação do NO, do monofosfato guanosina cíclico (GMPc) pois estes podem inibir a enzima fosfodiesterase-5 e deste modo estabilizar a GMPc, que é o segundo mensageiro do óxido nítrico. O peptídeo natriurético cerebral (BNP) é um hormônio produzido em resposta a sobrecarga de volume sobre os átrios e atua como antagonista do sistema renina-angiotensina-aldosterona, sendo um importante indicador da HAP. Em seres humanos e cães, numerosas doenças que resultam em disfunção ventricular direita estão associadas com o aumento deste peptídeo e a dosagem sérica é capaz de distinguir pacientes cardiopatas com doença respiratória daqueles sadios, tornando este peptídeo um bom marcador de doença cardiorrespiratória (ATKINSON et al. 2009).

2.5. Suínos como modelo experimental

Estudos em modelos animais experimentais de doenças cardiovasculares tem se tornado uma importante ferramenta na pesquisa cardiovascular humana. Os modelos experimentais com suínos têm sido amplamente utilizados em várias áreas da medicina, porém pouco se tem desenvolvido acerca dos estudos na área cardiopulmonar, mesmo considerando-se o tamanho cardíaco ser mais comparável com o de humanos, permitindo estudos em fisiologia e métodos não-invasivos da morfologia e função cardiovasculares (MAURENS et al., 2012; SWINDLE et al., 2012).

Suzuki et al (2008) relatam que o êxito de algumas técnicas, aplicadas às coronárias na cardiologia intervencionista, pode ser atribuído não somente aos estudos clínicos realizados com

seres humanos como também em estudos pré-clínicos realizados com modelo porcino. Esses animais tem sido usados ainda como modelo de pancreatite (BALDO et al., 2013), lesões de córnea (MEDEIROS, 2011), transplante intestinal (LLHANOS, 2008), transplante de valvas cardíacas (VRANDECIC et al., 1993) e até mesmo transplante multivisceral (DAVID et al., 2011).

O estabelecimento de um bom modelo animal tem sido essencial devido ao crescente número de doenças cardiopulmonares, especialmente a hipertensão pulmonar arterial, resultando em um uso amplo para estudos de terapias intervencionistas (CHEN et al., 2008). Segundo Roehl et al. (2009) a sensibilidade vascular pulmonar, a anatomia coronária aliado a suas características de perfusão, e a ausência de ventilação colateral fazem com que o suíno seja considerado um bom modelo experimental para hipertensão pulmonar em humanos quando comparado a outras espécies.

2.6. Monocrotalina

A MCT é uma substância alcalóide pirrolizidínico, sintetizada quimicamente e encontrada em folhas e sementes da planta *Crotalaria spectabilis* (MARTINEZ; DOS SANTOS e PINTO, 2013), sendo várias espécies deste gênero tóxicas para animais domésticos (TOKARNIA et al., 2012). No Brasil, a intoxicação natural por sementes dessa planta foi descrita em suínos, equinos e aves e a intoxicação experimental em suínos (TORRES et al, 1997; UBIALI et al., 2011) e caninos (BELLLODI, 2014). Em muitos lugares do mundo a *Crotalaria spp* é cultivada como fertilizante natural, devido a capacidade de fixar nitrogênio no solo (BOKHATIAR et al., 2003), o que aumenta o risco de intoxicação (HUEZA et al., 2009).

Os humanos podem ser expostos aos alcaloides pirrolizidínicos por meio do uso ou contaminação de ervas medicinais; consumo de leite, ovos mel ou grãos contaminados (BYRON, 1999; STEENKAMP et al., 2000).

Em um estudo realizado com suínos experimentalmente intoxicados com diferentes doses de sementes de *crotalaria spectabilis*, Souza et al (1997) reportaram que os mais sinais mais observados foram: edema subcutâneo nos membros, face e pescoço; palidez de mucosas; cerdas eriçadas; caquexia e apatia. Macroscopicamente o hidropericárdio foi a lesão mais observada. As lesões microscópicas mais evidentes foram: fibrose, proliferação de ductos biliares e

megalocitose no fígado; broncopneumonia e bronquite crônicas; megalocitose de células epiteliais tubulares renais, nefrose e nefrite crônica; gastrite e ulceração gástrica.

O principal órgão alvo das intoxicações por *C. spectabilis* é o fígado (BELLODI, 2014) e os principais sintomas nos animais estão relacionadas a hepatotoxicidade (HUEZA et al., 2009). A lesão causada pode evoluir para fibrose severa, insuficiência hepática e morte, em casos avançados (BELLODI, 2014). Relata-se necrose hepatocelular em diversas espécies, incluindo suínos, após consumo acidental de sementes dessa planta (UBIALI et al., 2011; BELLODI, 2014).

As lesões hepáticas causadas pelo consumo acidental de sementes de *Crotalaria spectabilis* podem variar conforme a dose, podendo ocorrer desde necrose hepatocelular (UBIALI et al., 2011; BELLODI, 2014) a megalocitose, fibrose e proliferação de ductos biliares. Também, são descritos em suínos broncopneumonia e bronquite crônicas, megalocitose das células epiteliais de túbulos renais, nefrose e nefrite crônica, gastrite e ulceração gástrica (HERATH et al., 2012). A lesão hepatocelular induzida por MCT constitui um modelo viável para o estudo de hepatopatias (HOYEET e XU, 2012).

A indução da HP por monocrotalina (MCT) tem sido muito utilizada em estudos experimentais (TORRES et al., 1997). Após sua administração, a MCT é metabolizada pelo fígado e transformada em monocrotalina pirrole (MCTP), sua forma ativa, a qual, após uma injeção subcutânea única pode causar lesão vascular no endotélio de vasos pulmonares, ativação plaquetária, reatividade pulmonar aumentada por vasoconstrição e hipertrofia muscular da camada média dos vasos pulmonares (SAWAMURA et al., 2009).

De acordo com Kanno et al. (2001), o principal fator relacionado à fisiopatologia da HAP induzida por MCT é a disfunção endotelial, seguida de remodelamento vascular pulmonar. Em modelos experimentais em ratos, o efeito tóxico da MCT é caracterizado por edema pulmonar, ascite e fibrose vascular por aumento nas concentrações plasmáticas de Ang II, substância responsável pelo aumento do conteúdo de colágeno no tecido cardíaco e pulmonar (LAMBERTS et al., 2007). Esse modelo animal também apresenta inflamação pulmonar, diminuindo a capacidade deste órgão juntamente com os rins de eliminar a ET-1 em excesso do sangue e pulmões, aumentando ainda mais a concentração dessa substância altamente vasoconstritora na circulação (CABRINI, 2009). Em suínos, Torres et al. (1997) utilizando doses altas de MCT observou que as alterações pulmonares induzidas pela MCT caracterizavam-se por graus

variáveis de espessamento dos septos alveolares, edema, congestão, hemorragia, fibrose, proliferação de pneumócitos tipo II, infiltrado linfocitário e neutrocitário, espessamento dos septos interlobulares por edema e fibrose, edema pulmonar e alterações vasculares caracterizadas por hialinização de arteríolas com tumefação das células endoteliais e proliferação da adventícia com espessamento da parede dos vasos pulmonares.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A HAP é uma afecção grave com prognóstico desfavorável. Não há cura e a terapia convencional é insuficiente. Por se tratar de uma afecção assintomática nas fases iniciais, o diagnóstico é retardado, o que piora o prognóstico. Portanto, estudos são necessários com finalidade de descobrir novos métodos diagnósticos e terapêuticos que possibilitem maior tempo de sobrevida com qualidade para esses pacientes. A Ang - (1-7) possui propriedades que podem contribuir para o controle da afecção, atuando diretamente sobre as células da vasculatura pulmonar e coração.

Nossa hipótese é que a Ang – (1-7) seja capaz de reduzir a lesão vascular em pacientes com HAP por meio da inibição da proliferação celular, atuando ainda como agente vasodilatador. A perspectiva é que novos estudos sejam realizados com a finalidade de avaliar a melhor dose e a ação do fármaco em pacientes humanos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, M.J.; PESSINA, P.; OLGUIN, H. et al. Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF- β signalling. **Hum. Mol. Gen.**, Oxford, Inglaterra, v. 23, n.5, 1237 – 1249 p. 2014.

ATKINSON, K.J.; FINE, D.M.; THOMBS, J.J. et al. Evaluation of pimobendan and N-terminal probrain natriuretic peptide in the treatment of pulmonary hypertension secondary to degenerative mitral valve disease in dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Denver, CO, v.23, p.1190-1196, 2009.

AVERILL, D. B.; ISHIYAMA, Y.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO C. M. Cardiac angiotensin-(1-7) in ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, Waltham, MA, V.108, p. 2141–2146, 2003.

BALDO, C. F.; CAPELLINI, V. K., CELOTTO, A. C. et al. Guanylate cyclase inhibition by methylene blue in circulatory shock caused by acute necrotizing pancreatitis: a word of caution based on a porcine model. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, RJ. v. 40, n. 6, p. 480-489, 2013.

BANDEIRA, M.L.S. e WAETGE, D. Objetivos terapêuticos e métodos de acompanhamento do tratamento da hipertensão arterial pulmonar. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 67-70, 2015.

BELLODI, C. Alterações hepáticas em cães intoxicados experimentalmente por sementes de *Crotalaria spectabilis* [dissertação]. Jaboticabal: UNESP; 2014.

BOKHTIAR, S. M.; GAFUR, M. A.; RAHMAN, A. B. M. M. Effects of *Crotalaria* and *Sesbania aculeata* green manures and N fertilizer on soil fertility and the productivity of sugarcane. **The Journal of Agricultural Science**, Novi Sad, Servia. v. 140, n. 03, p. 305-309, 2003.

BOON, J.A. Evaluation of size, function, and hemodynamics. In: _____. **Veterinary Echocardiography**. 2nd ed. Iowa: Wiley-Blackwell, p. 206-334. 2011.

British Cardiac Society Guidelines and Medical Practice Committee, and Approved by the British Thoracic Society and the British Society of Rheumatology. Recommendations on the management of pulmonary hypertension in clinical practice. **Heart**, Londres, Inglaterra vol. 86, 2001.

BYRON, J. Pyrrolizidine alkaloids in eggs; new alkaloid found in potatoes. **Food Chem. News**, Amsterdam. v. 14, p. 6-7, 1998.

CABRINI, F.P.H. **Implantação do modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. Avaliação eletrocardiográfica**. 2009. 99 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2009.

CHATTERJEE, K.; MARCO, T.D. e ALPERT, J.S. Pulmonary hypertension: hemodynamic diagnosis and management. **Archives of Internal Medicine**, San Francisco, CA, v.162, p.1925-33, 2002.

CHEN, L.; XIAO, J.; LI, Y. et al. Ang-(1-7) might prevent the development of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. Roma, Itália, vol. 15, p.1-7, 2011.

DAVID, A. I.; CHIDA, V. V., LEE, A. D. W et al. Multivisceral transplantation in pigs: a model for research and training. **Einstein**, São Paulo, SP. v. 9, n. 3, p. 372-376, 2011.

DIAS, M.M.; RUFINO R.; FERREIRA E. et al. Investigação hemodinâmica da hipertensão pulmonar. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 19-24, 2015.

FALCÃO-PIRES, I.; GONÇALVES, N.; HENRIQUES-COELHO T. et al. Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology, Circulation Physiology**, Bethesda, MD, v.296, p.H2007-H2014, 2009.

FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A.; ALMEIDA, A. P. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. **Hypertension**, Dallas, TX, v.38, p.665–668, 2001.

FERREIRA, A.J.; SANTOS, R.A.S.; BRADFORD, C.N. et al. Therapeutic Implications of the vasoprotective axis of the renin-Angiotensin system in cardiovascular diseases. **Hypertension**, Dallas, TX, v.55, p.207-213, 2010.

FERREIRA, A. J.; MORAES, P. L.; FOUREAUX, G. et al. The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis is expressed in sinoatrial node cells of rats. **J Histochem Cytochem**. v. 59, p.761–768, 2011.

FILHO, F.V.G. e CARRASCO, H.V.C.J. Hipertensão pulmonar. In: NOBRE, F., SERRANO JR, C.V. (Ed). **Tratado de Cardiologia SOCESP**. São Paulo: Manole, 2005. p.1114-1134.

GUIMARÃES, J.I.; LOPES, A.A.; AIELLO, V.D. et al. Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Pulmonar – **Diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia**, São Paulo, 2005.

HERATH, C. B.; MAK, K.; BURRELL, L. M. et al. Angiotensin-(1–7) reduces the perfusion pressure response to angiotensin II and methoxamine via an endothelial nitric oxide-mediated pathway in cirrhotic rat liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v.304, p.99-108, 2013.

HOEPER, M. M.; BOGAARD H.J.; CONDLIFFE R. et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, Washington, DC. v. 62, n. 25, 2013.

HOYERT, D.; XU, J. Deaths: preliminary data for 2011. In: Control CfD, editor. Hyattsville, MD: **National Center for Health Statistics**, 2012.

HUEZA, I. M.; BENASSI, J. C.; RASPANTINI P. C. F. et al. Low doses of monocrotaline in rats cause diminished bone marrow cellularity and compromised nitric oxide production by peritoneal macrophages. **Journal of immunotoxicology**, Reino Unido. v. 6, n. 1, p. 11-18, 2009.

JARDIM, C.; PRADA, L.F. e SOUZA, R. Definição e classificação da hipertensão pulmonar. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 3-8, 2015.

KANNO, S.; WU, Y.; LEE, P.C. et al. Angiotensin-converting inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circulation**, Waltham, MA, v.104, p. 945-950, 2001.

KELLIHAN, H.B. e STEPIEN, R.L. Pulmonary hypertension in canine degenerative mitral valve disease. **Journal of veterinary cardiology**, West Lafayette, IN, v. 14, n. 1, p. 149-164, 2012.

KUANG, T.; WANG, J.; PANG, B.; et al. Combination of sildenafil and simvastatin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, Roma, Itália, v. 3, p.1-9, 2010.

LAMBERTS, R.R.; VAESSEN, R.J.; WESTERHOF, N. et al. Right ventricular hypertrophy causes impairment of left ventricular diastolic function in the rat. **Basic Research in Cardiology**, Essen, Germany, v.102, p. 19-27, 2007.

LA GERCHE, A. e ROBERTS, T. J. Straining the RV to Predict the Future. **JACC: Cardiovascular Imaging**, Washington, DC, v.8, n.2, p. 170-171, 2015.

LINDEN, M.D.; TORRES, F.X.; KUBUS, J. et al. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **American Journal of Clinical Pathology**, Oxiford, Inglaterra, v.97, sup., p. s-4-13, 1992.

LLANOS, J. C. **Síndrome do intestino curto e transplante intestinal: modelo experimental porcino**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.

LOCATELLI, C.; SPALLA, I.; ZANABONI, A.M. et al. Assessment of right ventricular function by feature-tracking echocardiography in conscious healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, Amsterdã, Holanda, v. 105, p. 103-110, 2016.

DE MADRON, E.; CHETBOUL, V.; BUSSADORI, C. **Clinical Echocardiography of the Dog and Cat**. Elsevier Health Sciences, 2015.

MARTINEZ, S.T.; SANTOS, A.P.B. dos ; PINTO, A.C. A Determinação Estrutural do Alcaloide Pirrolizidínico Monocrotalina: Exemplo dos Desafios da Química de Produtos Naturais Até os Anos Sessenta do Século XX. **Revista Virtual de Química**, Niteroi, RJ, v. 5, n. 2, p. 300-311, 2013.

MARTINS, L. Jr. Hipertensão pulmonar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, Sorocaba, SP, v. 16, n. 4, p. 161-163, 2014.

MCGOON, M.D.; BENZA, R.L.; ESCRIBANO-SUBIAS P. et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. **Journal of the American College of Cardiology**, Washington, DC, v. 62, n. 25_S, 2013.

MEDEIROS, F. W. de. **Alterações biomecânicas da córnea de suínos induzidas pela confecções de lamelas pediculadas de diferentes espessuras por laser de femtossegundo**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MEURENS, F.; SUMMERFIELD, A.; NAUWYNCK, H. et al. The pig: a model for human infectious diseases. **Trends Microbiology**, Cambridge, MA, 2012; 20(1):50-57.

MINAI, O. Hipertensão pulmonar na DPOC: Revisão Da Literatura. **PVRI Review**, Skokie, Illinois, v. 2, p. 44, 2010.

OLSCHEWSKI, H.; ROSE, F.; GRUNIG, E. et al. Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Amsterdã, Holanda, v.138, p.367-377, 2001.

PEI, Z.; MENG, R.; LI, G. et al. Angiotensin-(1-7) ameliorates myocardial remodeling and interstitial fibrosis in spontaneous hypertension: role of MMPs/TIMPs. **Toxicology letters**, Amsterdã, v. 199(2), p. 173-181, 2010.

PIETRA G.G.; CAPRON F.; STEWART S. M, et al. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. **Journal of the American College Cardiology**, Washington, DC, v.43, n.12, p. 25-32, 2004.

RAJAGOPAL, S.; FORSHA, D.E.; RISUM, N. et al. Comprehensive assessment of right ventricular function in patients with pulmonary hypertension with global longitudinal peak systolic strain derived from multiple right ventricular views. **Journal of the American Society of Echocardiography**, Morrisville, NC, v. 27, n. 6, p. 657-665, 2014.

RAMOS, R.P.; FERREIRA, E.V.M.; ARAKAKI, J.S.O. Estratégias do Tratamento da Hipertensão Arterial Pulmonar. **Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 71-77, 2015.

ROEHL, A.B.; STEENDIJK, P.; BAUMERT, J.H. et al. Comparison of 3 methods to induce acute pulmonary hypertension in pigs. **Comparative Medicine**, Memphis, TN, v.59, p.280-286, 2009.

ROMAN, A.; LÓPEZ-MESEGUER, M.; DOMINGO, E. Tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. **Medicina Clínica**, Barcelona, Espanha, v. 144, n. 12, p. 566-570, 2015.

ROSENBLUM, W.D. Pulmonary arterial hypertension. **Cardiology in Review**, Valhalla, NY, v.18, p.58-63, 2010.

RUFINO, R.; COSTA, C.H.; ABBUD, B. et al. Hipertensão arterial pulmonar: uma proposta multidisciplinar. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, 2013.

RUNO, J.R. e LOYD, J.E. Primary pulmonary hypertension. **The Lancet**, Londres, Inglaterra, v.361, p.1533-1544, 2003.

SABELA, A. K. D. A.; MARIANO, T.B.; OLIVEIRA, A.C. et al. Análise da remodelação cardíaca em animais com insuficiência cardíaca (ic) induzida pela monocrotalina submetidos a treinamento físico preventivo. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, SP, 2015. p. 48-56.

SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; NADU, A. P. et al. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in Rats. **Physiol Genomics**, Bethesda, MD. v.17, p.292–299, 2004.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A.J.; PINHEIRO, S.V. et al. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert opinion on investigational drugs**, London, United Kingdom v. 14, n. 8, p. 1019-1031, 2005.

SANTOS, R.A. dos. Angiotensin-(1–7). **Hypertension**, Dallas, TX, v.63, n.6, p.1138-1147, 2014.

SAWAMURA, F.; KATO, M.; FUJITA, K. et al. Tadalafil, a long-acting inhibitor of PDE5, improves pulmonary hemodynamics and survival rate of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, Japan, v.111, p.235-243, 2009.

SERRES F, CHETBOUL V, GOUNI V, et al. Diagnostic value of echo-Doppler and tissue Doppler imaging in dogs with pulmonary arterial hypertension. **Journal Veterinary Internal Medicine**, Denver, CO. v21, p.1280–9. 2007.

SHI, L.; MAO, C.; XU, Z. et al. Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases. **Drug Discovery Today**, Richmond, VA v.15: p. 332–341, 2010.

SOUZA, A. C.; HATAYDE, M. R.; BECHARA, G. H.. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae). **Pesq. Vet. Bras**, Rio de Janeiro, RJ. v. 17, n. 1, p. 12-18, 1997.

STEENKAMP, V.; STEWART, M. J.; ZUCKERMAN, M. Clinical and analytical aspects of pyrrolizidine poisoning caused by South African traditional medicines. **Therapeutic Drug Monitoring**, USA. v. 22, n. 3, p. 302-306, 2000.

STENMARK K.R.; MEYRICK B.; GALIE N. et al. Animal models of pulmonary arterial hypertension: The hope for etiological discovery and pharmacological cure. **American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, Bethesda MD, v.297, n.6, p.1013-1032, 2009.

SUBRAMANYAM, N.M.; NOSSAMAN, B.D. e KADOWITZ, P.J. New approaches to the treatment of pulmonary hypertension. **Cardiology in Review**, Valhalla, NY, v.18, p.76-84, 2010.

- SUZUKI, Y.; YEUNG, A. C.; IKENO, F. et al. Importância dos estudos pré-clínicos em animais de experimentação para a cardiologia intervencionista. **Arq Bras Cardiol**, v. 91, n. 5, p. 348-60, 2008.
- SWINDLE, M.M.; MAKIN, A.; HERRON, A.J. et al. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. **Veterinary Pathology Online**, Thousand Oaks, CA, v. 49, n. 2, p. 344-356, 2012.
- TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D. et al. Plantas Tóxicas do Brasil, Helianthus: 2012.
- TORRES, M. B. A.; SALLES, M. W. S.; HEADLEY, A. S. et al. Intoxicação experimental por sementes de *Crotalaria spectabilis* (*Leguminosaea*) em suínos. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, RS. v. 27, p. 307-312, 1997.
- TUDER, R.M; MARECKI, J.C.; RICHTER, A. et al. Pathology of pulmonary hypertension. **Clinics in chest medicine**, Maryland Heights, MO, v. 28, n. 1, p. 23-42, 2007.
- UBIALI, D. G.; BOABAID, F. M.; BORGES, N. A. et al. Intoxicação aguda com sementes de *Crotalaria spectabilis* (*Leg. Papilionoideae*) em suínos. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, RJ. v.31(4), p. 313-318, 2011.
- VRANDECIC, M. O.; GONTIJO FILHO, B., FANTINI, F. A. et al. Transplante de valva mitral heteróloga. Nova alternativa cirúrgica: estudo clínico inicial. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, Rio Preto, SP. v. 8, n. 2, p. 83-90, 1993.
- WANG, Y.; QIAN, C.; ROKS, A. et al. Circulating rather than cardiac angiotensin-(1-7) stimulates cardioprotection post-myocardial infarction. **Circulation:Heart failure**, Waltham, MA, v. 3, p.286-293, 2010.
- WEITZENBLUM, E.; HIRTH, C.; DUCOLONE, A. et al. Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, Old Tappan Road, NJ, v. 36, p.752 – 758. 1981.
- WESS, G.; KELLER, L.J.M.; KLAUSNITZER, M. et al. Comparison of longitudinal myocardial tissue velocity, strain, and strain rate measured by two-dimensional speckle tracking and by color tissue Doppler imaging in healthy dogs. **Journal of Veterinary Cardiology**, West Lafayette, IN, v. 13, n. 1, p. 31-43, mar. 2011.
- WROBEL, K-H.; BICKEL, D. e KUJAT, R. Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **Cellular Tissue Research**, Freiburg, German, v. 283, p.191-201, 1996.

WU, Z-T; REN, C.Z.; YANG, Y.H. et al. The PI3K signaling-mediated nitric oxide contributes to cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in the nucleus tractus solitarii of rats. **Nitric Oxide**, Rochester, NY, v. 52, p. 56-65, 2016.

ZAGOLIN, M. e LLANCAQUEO, M. Hipertensión pulmonar: importancia de un diagnóstico precoz y tratamiento específico. **Revista Médica Clínica Las Condes**, Santiago, Chile, v. 26, n. 3, p. 344-356, 2015.q

ZENG, W.; CHEN, W.; LENG, X. et al. Chronic angiotensin-(1-7) administration improves vascular remodeling after angioplasty through the regulation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in rabbits. **Biochemical Biophysical Research Communication**, Martinsried, Germany, v.389, p. 138-144, 2009.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO

Título: Efeitos da angiotensina – (1-7) na função cardíaca do ventrículo direito e no remodelamento vascular em suínos com hipertensão pulmonar induzida*

*Este artigo é uma versão preliminar, considerando que o conselho editorial do periódico, ao qual será posteriormente submetido, poderá sugerir alterações para adequá-lo ao seu próprio estilo.

EFEITOS DA ANGIOTENSINA – (1-7) NA FUNÇÃO CARDÍACA DO VENTRÍCULO DIREITO E NO REMODELAMENTO VASCULAR EM SUÍNOS COM HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA

Luiz Eduardo Duarte de Oliveira^a, Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi^{a*}, Mary Suzan Veraschin^b, Claudine Botelho de Abreu^a, Rafael Carneiro Costa^b, Tatiana Schulien^a, Leonardo Augusto Lopes Muzzi^c, Elaine Maria Seles Dorneles^d, Giancarla Aparecida Botelho Santos^e, Laura Cristina Jardim Porto^f, Robson Augusto Souza dos Santos^g

^aLaboratório de Cardiologia Aplicada, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. ralmuzzi@dmv.ufla.br

^bLaboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^cSetor de Cirurgia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^dSetor de Epidemiologia e Saúde Pública, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^eDepartamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^fDepartamento de Nutrição, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

^gInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT-NanoBiofar), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

RESUMO

A hipertensão pulmonar é uma afecção complexa caracterizada por disfunção endotelial que resulta em remodelamento vascular e elevação da pressão arterial pulmonar. Até o momento, não há cura, sendo necessário o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos. Estudos têm proposto que a angiotensina-(1-7) exerça efeitos dilatadores e também diminua o remodelamento vascular pulmonar. Este trabalho teve por objetivo estudar o potencial terapêutico da angiotensina-(1-7) em suínos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. O experimento foi realizado em 14 suínos, avaliados por meio da eletrocardiografia, ecocardiografia, pressão arterial sistêmica sistólica, peptídeo natriurético cerebral e óxido nítrico, em seguida foi administrado monocrotalina por via intravenosa induzindo a hipertensão arterial pulmonar. Posteriormente foram divididos em dois grupos (n=7), sendo grupo placebo e grupo

tratado com angiotensina-(1-7). Ao final de 60 dias os animais foram eutanasiados e tiveram fragmentos do coração e pulmões coletados para análise histopatológica, histoquímica e imunohistoquímica. O grupo placebo apresentou alterações eletrocardiográficas (aumento da amplitude da onda T, no intervalo QT e eixo cardíaco deslocado para a esquerda) e maiores valores de pressão arterial sistólica aos 60 dias (GP $97,57 \pm 13,36$ e GT $87,14 \pm 10,45$). Na ecocardiografia convencional do ventrículo direito observou-se alteração nos índices relação artéria pulmonar/aorta, índice de performance miocárdica e tempo sistólico ventricular direito em ambos os grupos, sendo de menor gravidade no grupo tratado (AP:Ao: GP $1,22 \pm 0,11$ e GT $1,06 \pm 0,03$ – $p=0,035$; IPM: GP $0,30 \pm 0,02$ e GT $0,27 \pm 0,05$ – $p=0,02$; TA:TE: GP $0,26 \pm 0,03$ e GT $0,27 \pm 0,01$ – $p=0,03$). Na modalidade *Feature tracking* bidimensional foi observada redução da taxa de deformação miocárdica do ventrículo direito no grupo placebo (St global: GP $17,37 \pm 2,87$ e GT $23,71 \pm 7,87$ – $p=0,034$; StR global: GP $1,47 \pm 0,28$ e GT $2,02 \pm 0,69$ – $p=0,036$). A concentração de peptídeo natriurético cerebral não diferiu entre os grupos. A concentração de óxido nítrico foi significativamente maior no grupo tratado aos 30 ($p=0,03$) e 60 dias ($p=0,008$). A avaliação histopatológica evidenciou lesões cardíacas e pulmonares menos acentuadas no grupo tratado. Os dados obtidos demonstram a ação benéfica da angiotensina-(1-7) em pacientes com hipertensão pulmonar sendo esse peptídeo promissor no controle da disfunção cardíaca direita e no remodelamento da vasculatura pulmonar.

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença grave caracterizada pela disfunção endotelial e aumento da resistência na vasculatura pulmonar, resultando em *cor pulmonale*, insuficiência cardiopulmonar e morte do paciente [1,2].

Acredita-se que a disfunção endotelial seja o primeiro passo no remodelamento vascular das artérias pulmonares durante o desenvolvimento da HAP [3], resultando na diminuição da produção e expressão de vasodilatadores, tais como óxido nítrico e prostaciclina e superprodução e hiperexpressão de vasoconstritores, tais como tromboxane A2 e endotelina-1 (ET-1) [4,5].

O diagnóstico da HAP é de difícil realização. A maioria dos pacientes que apresentam a afecção tende a ser assintomática nos estágios iniciais [2]. A cateterização cardíaca e ecocardiografia são métodos que permitem avaliar a pressão na artéria pulmonar, possibilitando a determinação do diagnóstico [6,7].

A ecocardiografia é rotineiramente utilizada para avaliação de pacientes com HAP [8], sendo o ventrículo direito (VD) considerado um dos mais importantes preditores da evolução clínica em pacientes com doença cardiopulmonar [9]. Alguns índices como a relação Artéria pulmonar/Aorta (AP:Ao), o índice de performance miocárdica (IPM) do VD e, o tempo de

intervalo sistólico do VD (TA:TE) são indicados para avaliação de pacientes acometidos pela enfermidade [10]. Entretanto, a técnica convencional não inclui uma avaliação clara da função miocárdica [8].

Nos últimos anos surgiram novas técnicas de avaliação da função ventricular, incluindo índices como *Feature Tracking* bidimensional (FTI-2D) que fornece imagens da taxa de deformação, possibilitando a avaliação da função miocárdica regional e o diagnóstico precoce de disfunções miocárdicas [11]. Assim, foi possível incorporar ao exame ecocardiográfico novos índices como o *strain* (*St*) e o *strain rate* (*StR*). O *St* refere-se à magnitude de deformação da fibra miocárdica, cuja unidade é dada em %. e o *StR* consiste na velocidade que esta deformação acontece e sua unidade representada por 1/s ou s⁻¹ [12].

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um papel crucial na regulação cardiovascular. A angiotensina-(1-7) (Ang – (1-7)) é um peptídeo bioativo, produzido em uma via alternativa do sistema renina angiotensina [13]. A ECA2, um homólogo da enzima conversora de angiotensina, degrada a angiotensina II (Ang II) em Ang–(1-7) [14]. Esse peptídeo exerce efeitos físicos opostos aos da Ang II por meio de receptores Mas, como vasodilatação e inibição da proliferação celular [15], sendo estes potenciais fatores benéficos para a terapia da HAP.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial terapêutico da Ang–(1-7) em suínos com hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina, assim como estabelecer o diagnóstico precoce da afecção por meio da avaliação ecocardiográfica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 14 suínos, machos e fêmeas, da linhagem comercial TOPIGS (Landrace X Large White), oriundos de rebanho livre de doenças infectocontagiosas. Aos 28 dias de idade os animais foram desmamados, selecionados por exame físico, eletrocardiográfico e laboratorial. Foram incluídos no estudo suínos saudáveis sem sinais de afecções respiratórias e cardiovasculares. Os animais foram mantidos em baias contendo comedouros semiautomáticos e bebedouros do tipo chupeta e receberam dieta padrão e água *ad libidum*.

Durante o experimento foram mantidos no Centro Experimental de Suínos (CES) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brasil. Todos os protocolos foram realizados mediante a aprovação do comitê de ética para o uso de animais desta mesma instituição (protocolo n° 002/2010).

Aos 40 dias de vida, na fase de creche, os animais foram identificados em fichas próprias, examinados e sedados com diazepam (0,5-1,0 mg/kg) e azaperone (4,0 mg/kg) via intramuscular profunda. Após um período de repouso de 15 minutos foi coletada uma alíquota de sangue para avaliação laboratorial. Em seguida, tiveram a veia da orelha cateterizada e receberam monocrotalina na dose de 10 µg/kg, em uma concentração de 0,5 µg /mL. Posteriormente foram divididos em dois grupos, sendo o mesmo número de machos e fêmeas em cada grupo a fim de reduzir possíveis interferências. O primeiro grupo (GT, n=7) recebeu tratamento com Ang-(1-7) por via oral na dose de 0,5 mg/kg a cada 24 horas por 60 dias [16,17]. O segundo grupo (GP, n=7) recebeu placebo com mesmo veículo e posologia. Os animais foram monitorados por meio de exame clínico diário nas baias. Todo o estudo foi conduzido num ensaio duplo-cego, randomizado e placebo controlado.

Os exames eletrocardiográfico, ecocardiográfico, pressão arterial sistêmica sistólica, concentração sérica de peptídeo natriurético cerebral (BNP) e óxido nítrico (NO) foram realizados imediatamente antes da indução da HAP e mensalmente. Ao final de 60 dias, os suínos foram eutanasiados, necropsiados e tiveram o pulmão e coração avaliados por meio de histopatologia, histoquímica e imunohistoquímica, visando avaliar a resposta dos tecidos ao vasodilatador e ao placebo.

2.1. Avaliação eletrocardiográfica

Para avaliação eletrocardiográfica, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito [18]. Os traçados foram obtidos pelo método convencional monocal (ECG 6 Ecafíx®). Foram avaliados a frequência cardíaca, o ritmo, as ondas e os intervalos. O ECG foi registrado em 50mm/s e N.

2.2. Pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica foi obtida pelo método Doppler (Parks medical, 811B Veterinary®), sobre o terço proximal da região radioulnar. Foram obtidas cinco aferições e a média entre elas registradas.

2.3. Avaliação ecocardiográfica

Para os estudos ecocardiográficos, foi utilizado um aparelho de ecocardiografia (MyLab 40 Esaote[®]), com transdutores de varredura setorial eletrônica multifrequencial de 4–10 MHz e com acompanhamento eletrocardiográfico no monitor. Para a realização do exame os animais foram sedados e contidos gentilmente em decúbito lateral direito e esquerdo. Avaliações ecocardiográficas convencionais foram obtidas pelos cortes paraesternais longitudinais direito e esquerdo. Foram avaliados o fluxo da valva pulmonar e a relação entre o tempo de aceleração e tempo de ejeção (TA/TE), os picos de velocidade diastólico inicial e tardio (ondas E e A) do fluxo tricúspide, assim como a relação onda E/A e em seguida foi calculado o índice de performance do miocárdio, a partir do fluxo da valva tricúspide e da valva pulmonar [10], e ainda a relação entre os diâmetros da artéria pulmonar e da Aorta (AP: Ao). A obtenção das imagens e as avaliações da ecocardiografia convencional foram realizadas como recomendado por Boon (2011) [19]. Todos os exames foram realizados pelo mesmo ecocardiografista (RAL Muzzi) e foram realizadas três mensurações de todas as variáveis, calculando-se a média desses valores para cada uma delas.

Três a cinco ciclos cardíacos consecutivos utilizando uma monitorização contínua do ECG foram armazenados em formato digital para a realização da ecocardiografia bidimensional FTI-2D. As análises foram realizadas *off-line* por meio do *software* XStrain, algoritmo *optical flow* (versão 10.1, Esaote). Para o *strain* longitudinal do VD, *cine-loops* foram adquiridos a partir do corte apical longitudinal esquerdo, com taxas de *frames* médios de 63,10 *frames/s*, e seis medidas foram obtidas em duas imagens diferentes (três para cada imagem) no final da sístole, e, em seguida, a média foi obtida. Para o estudo, a borda do endocárdio foi marcada manualmente, e, logo após, a borda epicárdica foi marcada automaticamente pelo *software*, realizando ajustes quando necessário. Gráficos e curvas das variáveis estudadas foram apresentados pelo *software*, e os valores de pico sistólico de St longitudinal e StR longitudinal foram mostrados para as regiões endocárdica e epicárdica do VD.

2.4. Concentração sérica de BNP e NO

Após a punção venosa o sangue foi depositado em tubos Vacutainer[®] contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), centrifugado para a separação do plasma e conservado a -80° C até a realização dos testes. A dosagem do peptídeo natriurético cerebral (BNP) foi determinado

pelo método ELISA utilizando kit BNP-32 (porcine) Phoenix Pharmaceutical Inc[®]. Para obtenção do óxido nítrico (NO) foi utilizado o Kit DINO-250[®] BioAssay Systems.

2.5. Avaliação anatomopatológica

A eutanásia dos animais foi realizada por meio de uma overdose de Tiopental sódico, sendo os pulmões e coração coletados e pesados após o procedimento. Para a avaliação histológica amostras de tecido foram fixadas em formol a 10% tamponado com fostato, no pH 7,2, 0,01M. Após a fixação o material foi clivado, incluído em parafina, cortado a cinco micrômetros e corado pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram submetidos à coloração histoquímica pelo Tricrômico de Masson para melhor visualização das fibras colágenas. Todas as análises foram realizadas por patologista experiente em um estudo cego.

Os fragmentos do coração foram coletados do ventrículo direito, enquanto os do pulmão foram coletados do lobo cranial direito. Os parâmetros área total, área luminal, diâmetro externo e interno da parede muscular das artérias (12 artérias/pulmão) foram analisadas. Para cada artéria, a hipertrofia da média foi calculada pela fórmula: % espessamento da parede = [(espessura da média x 2)/(diâmetro externo)] x 100, como sugerido por Falcão-Pires et al. (2009).

Para identificar células ativas no ciclo celular foi realizada a marcação imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-PCNA (Antígeno Nuclear de Células em Proliferação – Dako, USA) na diluição de 1:2000, e o kit comercial Dual Link HRP (Dako, USA). A reativação antigênica foi realizada mediante irradiação em forno de microondas na potência máxima por 6 minutos com as lâminas imersas em tampão TRIS-EDTA pH 9,0. Como cromógeno foi utilizado o DAB (3,3,-diaminobenzidina) (Dako, USA).

2.6. Análise estatística

Com exceção da análise histopatológica, onde foi empregada estatística descritiva, os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism[®]-version 5.0. Todos os dados foram testados quanto à normalidade utilizando-se o teste Shapiro Wilk. As variáveis apresentaram distribuição normal e foram submetidas ao teste de Tukey para comparação entre os dias de tratamento e ao teste-t não pareado para comparação entre os grupos. A repetibilidade (variabilidade interobservador) das variáveis St e StR foi obtida por meio da análise de 60% dos animais de cada grupo selecionados

aleatoriamente, sendo determinada pelo coeficiente de correlação intraclasse e seu intervalo de confiança, por meio do software MedCalc[®]-version 16.8.

3. RESULTADOS

A eletrocardiografia foi obtida nos 14 suínos e apenas no dia 60 observou-se um aumento numérico na amplitude da onda T, no intervalo QT e eixo cardíaco com deslocamento para a esquerda nos animais do grupo placebo em comparação com o grupo tratado. As demais avaliações permaneceram dentro dos valores normais para a espécie.

Em relação à pressão arterial sistêmica sistólica, todos os valores ficaram dentro do padrão de normalidade da espécie. Pode-se observar que o grupo placebo apresentou maior valor aos 60 dias ($p < 0,05$) se comparado ao grupo tratado (GP $97,57A \pm 13,36$ e GT $87,14 \pm 10,45B$)

Na Tabela 1 estão dispostos os dados obtidos por meio da ecocardiografia convencional. Não foram observadas diferenças estatísticas entre GP e GT no dia 0. No GP a relação AP:Ao foi maior ($p = 0,025$; $p = 0,035$) e a relação TA:TE do fluxo pulmonar menor ($p = 0,01$; $p = 0,03$) nos dias 30 e 60 em contraste com o grupo tratado, que apresentou uma redução ao 60 dias. O IPM do VD foi significativamente maior no GP aos 60 dias.

Foi observada redução da velocidade e pressão sistólica do fluxo pulmonar aos 60 dias no grupo tratado, embora os valores estivessem dentro do padrão de normalidade. Em relação ao fluxo da valva tricúspide, nos animais do grupo placebo houve uma elevação na velocidade e pressão da onda A e redução da relação E:A. Com relação ao TA:TE foi observada uma redução no GT aos 60 dias.

Tabela 1. Valores referentes a ecocardiografia convencional de suínos com HAP tratados e não tratados com Ang-(1-7) após indução por monocrotalina.

VARIÁVEL	Dia 0		Dia 30		Dia 60	
	GP	GT	GP	GT	GP	GT
Pul (m/s)	0,76 ± 0,07	0,75 ± 0,05 A	0,76 ± 0,10	0,78 ± 0,07 AB	0,71 ± 0,06	0,69 ± 0,08 B
Pul (mmHg)	2,30 ± 0,44	2,27 ± 0,30 A	2,36 ± 0,69	2,47 ± 0,45 AB	2,07 ± 0,34	1,90 ± 0,44 B
Tric E (m/s)	0,70 ± 0,09	0,62 ± 0,04	0,63 ± 0,10	0,67 ± 0,15	0,63 ± 0,08	0,69 ± 0,11
Tric E (mmHg)	1,98 ± 0,47	1,56 ± 0,20	1,60 ± 0,51	1,86 ± 0,81	1,61 ± 0,36	1,96 ± 0,60
Tric A (m/s)	0,54 ± 0,11 A	0,55 ± 0,09	0,63 ± 0,10 B	0,62 ± 0,14	0,75 ± 0,17 C	0,63 ± 0,12
Tric A (mmHg)	1,20 ± 0,46 A	1,26 ± 0,42	1,63 ± 0,50 A	1,53 ± 0,63	2,39 ± 1,03 B	1,63 ± 0,61

E/A (m/s)	1,34 ± 0,31 A	1,15 ± 0,18	1,03 ± 0,32 B	1,15 ± 0,45	0,9 ± 0,33 C	1,12 ± 0,23
IPM	0,22 ± 0,02 A	0,21 ± 0,03 A	0,29 ± 0,03 B	0,29 ± 0,03 B	0,30 ± 0,02 aB	0,27 ± 0,05 bAB
AP:Ao	0,98 ± 0,01 A	0,98 ± 0,01 A	1,16 ± 0,09 a B	1,08 ± 0,05 b B	1,22 ± 0,11 a B	1,06 ± 0,03 b B
Pul TA:TE	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01 A	0,26 ± 0,03 a	0,28 ± 0,01 b AB	0,26 ± 0,03 a	0,27 ± 0,01 aB

GP, grupo placebo; GT, grupo tratado; Pul, pulmonar; Tric, tricúspide; E, onda E; A, onda A; IPM, índice de performance miocárdica; AP, artéria pulmonar; Ao, aorta; TA, tempo de aceleração; TE, tempo de ejeção. ^{A,B,a,b} Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Na Tabela 2 estão dispostos os dados obtidos para as variáveis *St* e *StR*. Com relação ao *St* pode-se observar que, para o grupo tratado com Ang-(1-7), quanto aos dias de tratamento, não houve diferença. Entretanto, para o grupo placebo, houve redução da taxa de deformação miocárdica. Na comparação entre os grupos, não houve diferença no D0. Aos 30 e 60 dias os animais do grupo placebo apresentaram menor deformação miocárdica comparado ao grupo tratado.

Com relação ao *StR*, pode-se observar que, para o grupo placebo, houve uma redução significativa da taxa de deformação. Quanto ao grupo tratado com Ang-(1-7), os valores obtidos aos 30 e 60 dias de tratamento não diferiram ($P > 0,05$) do dia zero. Na comparação entre os grupos não houve diferença quanto ao dia 0 e 30. Para o dia 60, foi observada diferença com redução da deformação endocárdica (*St* $p=0,037$; *StR* $p=0,023$) e global (*St* $p=0,034$; *StR* $p=0,036$) no grupo placebo.

Tabela 2. Valores referentes a *Strain* longitudinal e *Strain rate* longitudinal do ventrículo direito de suínos com HAP tratados e não tratados com Ang – (1-7).

VARIÁVEL	Dia 0		Dia 30		Dia 60	
	GP	GT	GP	GT	GP	GT
<i>Strain</i> longitudinal (%)						
<i>St</i> endo	24,64 ± 3,13 A	25,12 ± 1,24	19,41 ± 3,24 B	22,03 ± 3,70	17,25 ± 3,43 a B	23,68 ± 8,00 b
<i>St</i> epi	23,70 ± 3,80	21,96 ± 1,41	21,97 ± 4,19 a	26,76 ± 4,24 b	17,49 ± 5,03	23,80 ± 8,09
<i>St</i> global	24,17 ± 3,05 A	23,54 ± 1,09	20,79 ± 2,63 a AB	24,40 ± 3,58 b	17,37 ± 2,87 a B	23,71 ± 7,87 b
<i>Strain rate</i> longitudinal (m/s)						
<i>StR</i> endo	2,63 ± 0,32 A	2,32 ± 0,27	2,10 ± 0,31 B	1,94 ± 0,65	1,45 ± 0,34 a C	2,05 ± 0,63 b
<i>StR</i> epi	2,45 ± 0,45 A	2,09 ± 0,30	2,26 ± 0,21 AB	2,25 ± 0,94	1,49 ± 0,41 B	2,00 ± 0,79
<i>StR</i> global	2,54 ± 0,35 A	2,20 ± 0,26	2,19 ± 0,24 A	2,10 ± 0,75	1,47 ± 0,28 a B	2,02 ± 0,69 b

GP, grupo placebo; GT, grupo tratado; St, strain; StR, strain rate; Endo, endocárdico; Epi, epicárdico. ^{A,B,a,b} Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas na coluna e minúsculas na linha diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A avaliação da repetibilidade demonstrou excelente correlação entre as variáveis ecocardiográficas St longitudinal epicárdico, St longitudinal global, StR longitudinal endocárdico, StR longitudinal epicárdico, StR longitudinal global; e satisfatória a boa entre St longitudinal endocárdico. Entretanto o intervalo de confiança (IC) foi amplo (Tabela 3).

Tabela 3 Variabilidade interobservador analisadas em 60% dos suínos (n=8) com Hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina selecionados aleatoriamente.

	CCI*	IC (95%)
St Long Endo	0,7249	0,3298 a 0,8878
St Long Epi	0,7709	0,4354 a 0,9071
St Long Global	0,7671	0,4415 a 0,9044
StR Long Endo	0,7706	0,4275 a 0,9074
StR Long Epi	0,7692	0,4319 a 0,9063
StR Long Global	0,7777	0,4664 a 0,9088

CCI, Coeficiente de correlação Intraclasse; IC (95%), intervalo de confiança a 95%; St, strain; StR, strain rate; Endo, endocárdico; Epi, epicárdico; Long, longitudinal.

* $\geq 0,75$, excelente; $0,4 \geq e < 0,75$, satisfatório a bom; $< 0,4$, baixo (FLEISS, 1981).

As concentrações séricas de BNP e NO estão representadas na figura 1. Não houve diferença estatística entre os grupos e dias de tratamento para o BNP, embora pode-se observar uma tendência clínica para aumento dos valores no grupo placebo. Com relação ao NO observou-se valores significativamente maiores no GT, em comparação ao GP, nos dias 30 e 60.

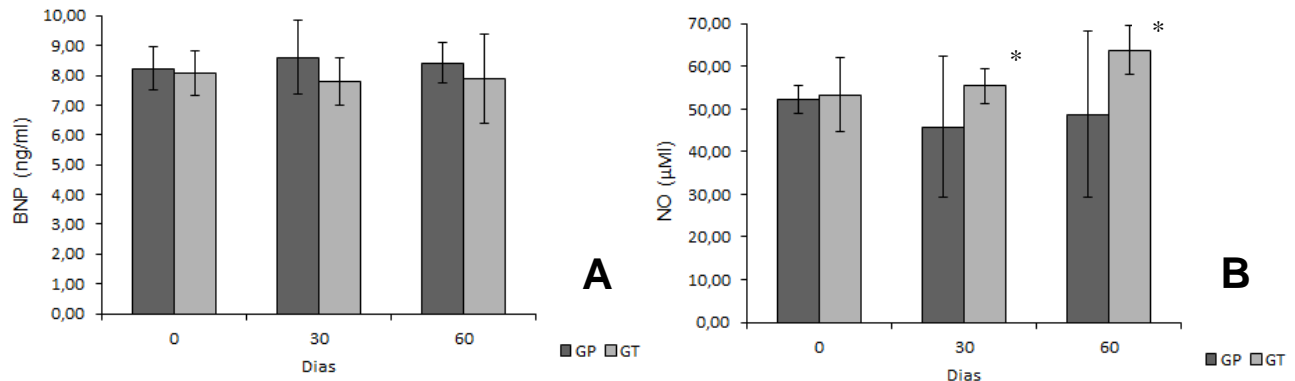


Figura 1 Hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em suínos. A: concentração sérica de peptídeo natriurático cerebral (BNP). B: concentração sérica de óxido nítrico (NO).

Com relação a avaliação anatomopatológica, não houve diferenças do peso dos pulmões e coração entre os animais dos grupos tratado e placebo.

As alterações pulmonares foram encontradas de forma aleatória em diferentes regiões dos lobos pulmonares. Nos animais tratados foram observadas áreas com discreto a moderado espessamento de septo por congestão e material eosinofílico (fibrina) no interstício. Já nos animais do grupo placebo, foi possível observar áreas com moderado a acentuado espessamento com material eosinofílico (necrose fibrinoide) e infiltrado inflamatório perivascular mononuclear moderado, artérias e arteríolas com moderado aumento de volume de células endoteliais que se projetam para a luz do vaso e moderada vacuolização nuclear das células da camada média, assim como vasculite, principalmente na camada adventícia, levando à dissociação das fibras (figura 2). Na coloração tricrômico de Masson, observou-se um aumento de tecido conjuntivo na camada média em alguns animais do grupo placebo. Além disso, observou-se imunohistoquímica com marcação positiva em células das camadas média e endotelial, e a coloração de tricrômico de Masson demonstrou a descontinuidade da camada média, bem como seu espessamento devido ao aumento do número de fibras colágenas nessa camada.

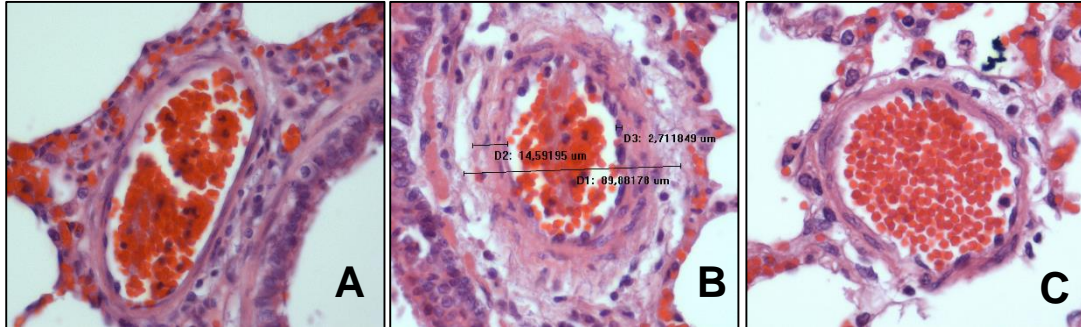


Figura 2 Hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em suínos. A: suíno sem alteração vascular. B: Suíno 4 do grupo placebo apresentando acentuado remodelamento. C: suíno 1 do grupo tratado com moderado remodelamento vascular H.E. Obj. 100x.

Na avaliação microscópica do coração, dois dos sete animais tratados apresentaram lesões discretas de espessamento de fibras cardíacas e megalocitose dos cardiomiócitos, e apenas em um deles havia um foco de necrose de miofibrila associado a infiltrado mononuclear discreto. Na coloração de tricrômico de Masson, não houve diferença em relação aos grupos, e na imunohistoquímica ocorreu marcação em um número moderado de núcleo dos cardiomiócitos de apenas um animal do grupo placebo.

4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstra resultados favoráveis da administração de Ang-(1-7) em suínos com HAP induzida por monocrotalina. Os animais do GT apresentaram lesões histológicas menos acentuadas, melhores índices ecocardiográficos e maior concentração sérica de NO quando comparados ao GP. Estudos anteriores demonstraram que a Ang-(1-7) inibiu o remodelamento vascular e a HAP em roedores [20], no entanto, não foram observados trabalhos com a administração da Ang-(1-7) em modelo experimental suíno.

A indução da HAP por monocrotalina foi efetiva, sendo comprovada pelas alterações vasculares observadas na histopatologia [21]. Entretanto, a elevação da pressão na artéria pulmonar e as alterações na concentração de BNP não foram observadas devido ao curto período entre a indução da lesão e a eutanásia dos animais, embora o BNP tenha demonstrado tendência de melhora no GT. O BNP é liberado pelo VD em resposta à elevação da pressão ou sobrecarga cardíaca [22], o que ocorreu de forma discreta mesmo no grupo placebo, devido ao fato de não ter havido doença crônica e aumento acentuado da pressão ventricular direita.

Os animais deste estudo não apresentaram quaisquer sinais de doença ou alteração no exame físico diário, fato já esperado pois a HAP é uma doença assintomática nas fases iniciais, o que a torna insidiosa e grave, sendo de difícil diagnóstico por não apresentar sinais clínicos até uma fase já tardia e com grande comprometimento da função cardiorrespiratória [2].

As alterações eletrocardiográficas observadas nos animais do GP aos 60 dias sugerem uma lesão miocárdica induzida pela monocrotalina. A ausência de alterações no ECG dos animais do GT pode estar associada à proteção miocárdica e aos efeitos antiarrítmicos [24] previamente atribuídos a Ang-(1-7).

Estudos com cães demonstraram que a avaliação ecocardiográfica da regurgitação tricúspide e pulmonar apresenta limitações para prever a HAP [26], desta forma, novos índices ecocardiográficos indiretos tem sido propostos para o diagnóstico preditivo da HAP, incluindo AP:Ao, IPM e o TA:TE [27], que foram empregados no presente estudo e indicaram efetividade e precocidade no diagnóstico de alterações relacionadas a HAP nos suínos. A elevação da relação AP: Ao indica a dilatação da artéria pulmonar, fato observado nos animais do grupo placebo, cujos valores foram estatisticamente superiores aos do grupo tratado. Em relação ao IPM que apresentou valores mais elevados no grupo placebo, indica redução do desempenho miocárdico

global, fornecendo suporte para o diagnóstico de HAP [10,19]. O tempo de aceleração (TA) é encurtado em pacientes com HAP e a relação de TA:TE conseqüentemente diminuída [19], o que de fato ocorreu no grupo placebo. A observação de melhores índices ecocardiográficos nos animais do GT pode ser explicada pela menor gravidade das lesões pulmonares nesse grupo, devido às diversas ações benéficas da Ang-(1-7) sobre a função cardíaca [24]. Dessa forma, a determinação de métodos de diagnósticos precoces e não-invasivos como estes empregados no estudo se reveste de importância.

Com relação as variáveis St e StR longitudinais do VD, o grupo tratado com Ang-(1-7) apresentou valores superiores ao grupo placebo ao final de 60 dias. Esse resultado indica melhora na função do miocárdio e pode ser atribuído aos efeitos do fármaco, que incluem a proteção miocárdica, a inibição do remodelamento cardíaco patológico e o efeito inotrópico positivo [24]. Estudos anteriores com ratos demonstraram que a Ang-(1-7) retarda a hipertrofia cardíaca por meio da redução da deposição de colágeno no miocárdio, tornando a contratilidade miocárdica mais eficiente [28]. Postula-se que o mesmo tenha ocorrido nos suínos deste estudo.

O grupo placebo, por sua vez, apresentou menor St e StR quando comparado ao grupo tratado. Esse fato pode ser explicado pela maior gravidade das lesões pulmonares nesse grupo, culminando no aumento da deposição de colágeno no VD com incremento correspondente na largura e continuidade dos componentes fibrilares da matriz extracelular podendo alterar a deformação e contração cardíaca [29]. A redução da deformação endocárdica observada no mesmo grupo indicam que a lesão iniciou no endocárdio. Estudos em humanos demonstraram que a função endocárdica foi mais significativa na avaliação de pacientes com doença coronariana, quando comparada a avaliação epicárdica [30].

As variáveis St e StR tiveram baixa variabilidade interobservador, apesar de apresentarem um amplo IC. O amplo IC sugere falta de precisão dos resultados, sendo um erro de medida provavelmente relativo ao número da amostra [31]. Assim, para se ter maior confiança na avaliação interobservador de St e StR, seria necessário um maior número de observações.

A concentração sérica de óxido nítrico foi maior no GT quando comparado ao GP após o início do tratamento. Estudos anteriores demonstraram que a ação vasodilatadora da Ang-(1-7) ocorre pela interação do peptídeo com o receptor Mas acoplado a proteína G, liberando NO e prostaglandinas [15,25]. A ativação desses receptores no endotélio vascular resulta na fosforilação da óxido nítrico sintetase (eNOS) e produção de NO que, por sua vez, ativa a

Guanilato ciclase induzindo a vasodilatação [14]. Postula-se que esta interação tenha ocorrido nos suínos deste estudo.

O GP apresentou pressão arterial sistêmica superior ao grupo ang-(1-7). Este resultado pode ser atribuído ao efeito vasodilatador e anti-hipertensivo da Ang-(1-7) no grupo tratado (fato reforçado pela maior concentração de NO nesse grupo) sendo este efeito amplamente relatado em outros estudos [15,23,24,25].

Os achados dos exames histopatológico, histoquímico e imunohistoquímico reforçam a ideia de que a ação benéfica da Ang-(1-7) sobre a HAP não está apenas relacionada ao efeito vasodilatador desse peptídeo, mas também à redução da lesão no órgão alvo. Apesar de todos os animais apresentarem lesões vasculares, os suínos do grupo Ang-(1-7) apresentaram lesões de menor gravidade quando comparados ao GP. Esse dado demonstra a ação direta da Ang-(1-7) na diminuição do remodelamento vascular, reduzindo a neoformação da túnica média e a síntese de colágeno, como já demonstrado em ratos [23] e coelhos [17], sendo estes fatores benéficos para o tratamento da hipertensão pulmonar.

Assim como relatado em estudos anteriores [33,34] o espessamento das artérias ocorreu de forma aleatória. Esse fato também ocorreu no presente trabalho. Entretanto, pela análise histopatológica, o número de vasos afetados e o grau de comprometimento aparenta ser maior nos animais do grupo placebo, afetando mais acentuadamente determinados indivíduos desse grupo.

Na histoquímica por tricrômico de Masson, em alguns animais do grupo placebo, foi observado um aumento de tecido conjuntivo na camada média. Esse achado sugere que o espessamento do vaso ocorre tanto pela deposição de tecido conjuntivo como pela hipertrofia das células musculares, sejam elas em divisão ou na tentativa de divisão de toda a camada do vaso, principalmente média e endotelial, uma vez que algumas células foram marcadas pela imunohistoquímica.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, os achados obtidos neste estudo demonstram a efetividade e o potencial terapêutico da Ang-(1-7) no controle da HAP induzida por monocrotalina em suínos. O peptídeo é promissor em reduzir a proliferação celular e os danos cardíacos. Conclui-se ainda que a ecocardiografia FTI-2D e os índices AP:Ao, IPM e TA:TE possibilitam o diagnóstico precoce

das alterações cardíacas decorrentes da afecção, podendo ser incluídos nos exames diagnósticos de rotina.

6. AGRADECIMENTOS

A Dra. Adriana Cristina da Silva (em memória), pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo financiamento deste estudo.

7. REFERÊNCIAS

- [1] McGoon MD, Benza RL, Escribano-Subias P, Jiang X, Miller DP, Peacock AJ et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62(25): 51-59.
- [2] Zagolin M e Llancaqueo, M. Hipertensión pulmonar: importancia de un diagnóstico precoz y tratamiento específico. *Rev Med Clin Conde*. 2015; 26(3): 344-356.
- [3] Nicod, LP. The endothelium and genetics in pulmonary arterial hypertension. *Swiss. Med. Wkly*. 2007; 137: 437-442.
- [4] Rufino R, Costa CH, Abbud B, Macri M, Ferreira E. Hipertensão arterial pulmonar: uma proposta multidisciplinar. *Revista HUPE*. 2013; 12(3): 61-73.
- [5] Ramos RP, Ferreira EVM, Arakaki JSO. Estratégias do Tratamento da Hipertensão Arterial Pulmonar. *Pulmão RJ*. 2015; 24(2): 71-77.
- [6] Hoepfer MM, Bogaard HJ, Conditte R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62(25): 42-50.
- [7] Dias MM, Rufino R, Ferreira E, Costa CH, Vilela VS. Investigação hemodinâmica da hipertensão pulmonar. *Pulmão RJ*. 2015; 24(2): 19-24.
- [8] Rajagopal S, Forsha DE, Risum N, Hornik CP, Poms AD, Fortin TA et al. Comprehensive assessment of right ventricular function in patients with pulmonary hypertension with global longitudinal peak systolic strain derived from multiple right ventricular views. *J Am Soc Echocardiogr*. 2014; 27(6): 657-665.
- [9] La Gerche A., Roberts TJ. Straining the RV to Predict the Future. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2015; 8(2): 170-171
- [10] Kellihan HB, Stepien RL. Pulmonary hypertension in canine degenerative mitral valve disease. *J Vet Cardiol*. 2012; 14(1): 149-164.
- [11] Locatelli C, Spalla I, Zanaboni AM, Brambilla PG, Bussadori C. Assessment of right ventricular function by feature-tracking echocardiography in conscious healthy dogs. *Research in Veterinary Science*. 2016; 105: 103-110.
- [12] Wess G, Keller LJM, Klausnitzer M, Killich M, Hartmann K. Comparison of longitudinal myocardial tissue velocity, strain, and strain rate measured by two-dimensional speckle tracking and by color tissue Doppler imaging in healthy dogs. *J Vet Cardiol*. 2011; 13(1): 31-43.

- [13] Acuña MJ, Pessina P, Olguin H, Cabrera D, Vio CP, Bader M, et al. Restoration of muscle strength in dystrophic muscle by angiotensin-1-7 through inhibition of TGF- β signalling. *Hum. Mol. Gen.* 2014; 23(5): 1237-1249.
- [14] Herath CB, Mak K, Burrell LM, Angus PW. Angiotensin-(1-7) reduces the perfusion pressure response to angiotensin II and methoxamine via an endothelial nitric oxide-mediated pathway in cirrhotic rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 304(1): 99-108.
- [15] Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs.* 2005;14:1019 –1031.
- [16] Petty WJ, Miller AA, McCoy TP, Gallagher PE, Tallant EA, Torti FM. Phase I and pharmacokinetic study of angiotensin-(1-7), an endogenous antiangiogenic hormone. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7398-404.
- [17] Zeng W, Chen W, Leng X, He JG, Ma H. Chronic angiotensin-(1-7) administration improves vascular remodeling after angioplasty through the regulation of the TGF- β /Smad signaling pathway in rabbits. *Biochemical Biophysical Research Communication.* 2009; 389: 138-144.
- [18] Tilley LP. *Essentials of canine and feline electrocardiography.* 3 ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1992. 1-252 p.
- [19] Boon JA. Evaluation of size, function, and hemodynamics. In: _____. *Veterinary Echocardiography.* 2nd ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2011, 206-334 p.
- [20] Chen L, Xiao J, Li Y, Ma H. Ang-(1-7) might prevent the development of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2011; 15: 1-7.
- [21] Sawamura F, Kato M, Fujita K, Nakazawa T, Beardsworth A. Tadalafil, a long-acting inhibitor of PDE5, improves pulmonary hemodynamics and survival rate of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats. *J Pharmacol Sci.* 2009; 111: 235-243.
- [22] Warwick G, Thomas PS, Yates DH Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2008; 32: 503–512.
- [23] Wu ZT, Ren CZ, Yang YH, Zhang RW, Sun JC, Wang YK et al. The PI3K signaling-mediated nitric oxide contributes to cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in the nucleus tractus solitarii of rats. *Nitric Oxide.* 2016; 52: 56-65.
- [24] Santos SHS, Andrade JMO, Fernandes LR, Sinisterra RDM, Sousa FB, Feltenberger JD, et al. Oral angiotensin-(1-7) prevented obesity and hepatic inflammation by inhibition of resistin/TLR4/MAPK/NF- κ B in rats fed with high-fat diet. *Peptides* 2013; 46:47-52.
- [25] Sampaio WO, Souza SRA, Faria SR, Machado MLT, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension* 2007;49:185–192.
- [26] Soydan LC, Kelliham HB, Bates ML, Stepien RL, Consigny DW, Bellofiore A et al. Accuracy of Doppler echocardiographic estimates of pulmonary artery pressures in a canine model of pulmonary hypertension. *J Vet Cardiol.* 2015; 17(1): 13-24.
- [27] Visser LC, Im MK, Johnson LR e Stern JA. Diagnostic Value of Right Pulmonary Artery Distensibility Index in Dogs with Pulmonary Hypertension: Comparison with Doppler Echocardiographic Estimates of Pulmonary Arterial Pressure. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 543–552.

- [28] Pei Z, Meng R, Li G, Yan G, Xu C, Zhuang Z et al. Angiotensin-(1-7) ameliorates myocardial remodeling and interstitial fibrosis in spontaneous hypertension: role of MMPs/TIMPs. *Toxicology letters*. 2010; 199(2): 173-181.
- [29] Kouzu H, Yuda S, Muranaka A, Doi T, Yamamoto H, Shimoshige S et al. Left ventricular hypertrophy causes different changes in longitudinal, radial, and circumferential mechanics in patients with hypertension: a two-dimensional speckle tracking study. *J Am Soc Echocardiogr*. 2011; 24(2): 192-199.
- [30] Sarvari SI, Haugaa KH, Zahid W, Bendz B, Aakhus S, Aaberge L et al. Layer-specific quantification of myocardial deformation by strain echocardiography may reveal significant CAD in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *JACC. Cardiovascular imaging*. 2013; 6(5), 535-544.
- [31] Matos DAS. Confiabilidade e concordância entre juízes: aplicações na área educacional. *Est Aval Educ*. 2014; 25(59): 298-324
- [32] Kuang T, Wang J, Pang B, Huang X, Burg ED, Yuan JXJ et al. Combination of sildenafil and simvastatin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Pulm pharmacol & therapy*. 2010; 23(5): 456-464.
- [33] Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM et al. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43(12), 25-32.
- [34] Coelho MR, Oliveira LED, Muzzi RAL, Oberlender G, Varaschin MS, Costa RC et al. Deformação miocárdica radial por meio do speckle tracking bidimensional em suínos com hipertensão pulmonar induzida e tratados com angiotensina-(1-7). *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2016; 68(4): 887-893.