

1. ÍNDICE

1.	ÍNDICE	1
2.	AGRADECIMENTOS	3
3.	PREFÁCIO	9
4.	RESUMO	13
5.	INTRODUÇÃO	19
	5.1 – A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP)	21
	5.2 – Modelo Experimental	34
	5.3 – Anatomo-patologia na HAP por monocrotalina	37
	5.4 – Ecocardiografia na HAP	40
6.	OBJECTIVOS DO ESTUDO EXPERIMENTAL	47
7.	MATERIAL E MÉTODOS	51
8.	RESULTADOS	65
9.	DISCUSSÃO	91
10.	CONCLUSÕES	97
11.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
12.	BIBLIOGRAFIA	105

2. AGRADECIMENTOS



“Obrigado” em linguagem gestual

2. AGRADECIMENTOS

“Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha.”

Autor desconhecido

Iniciei este caminho há dois anos atrás...Tratou-se de um desafio particularmente interessante, pois implicou uma adaptação pessoal a todo um esquema de novas metodologias de trabalho e a uma diferente forma de pensar em Medicina. De facto, a manipulação de animais de experimentação e o uso de certas técnicas laboratoriais tem exigências particulares, que transcendem os requisitos necessários ao exercício clínico diário com crianças. Reconheço também que o raciocínio em investigação se diferencia do raciocínio que estava habituada a usar para a realização de um diagnóstico ou atribuição de um esquema terapêutico.

Não poderia pois deixar de agradecer a todos os que contribuíram para este alargamento de horizontes e que me ajudaram a cumprir os objectivos a que me propus no início da caminhada:

Aos meus orientadores da tese, a Professora Filomena Botelho e o Professor António Cabrita, por terem aceitado acompanhar-me neste desafio.

Ao meu “Chefe”, Dr. Eduardo Castela, pelo alento dado nos momentos mais difíceis e pela protecção paternal que sempre lhe reconheci no olhar.

Aos meus colegas do Serviço de Cardiologia do Hospital Pediátrico de Coimbra, pelo entusiasmo com que acolheram este projecto. Uma palavra especial para a Dr^a Graça Sousa e Dr. António Pires pela sua disponibilidade e ajuda nos meus primeiros passos na ecocardiografia em pequenos animais de laboratório.

À Dr^a Margarida Abrantes e Dr^a Karen Cavalgante pelo apoio na logística, manipulação e necrópsia dos animais.

Ao Professor Adelino Leite Moreira e sua colaboradora, Dr^a Ana Pires, por terem partilhado a sua experiência no modelo de hipertensão pulmonar com monocrotalina.

Deixei propositadamente a minha família para último, para poder ter a liberdade de dar um tom mais intimista ao texto. Só assim me parece justo lhes mostrar o meu apreço...

Aos meus pais, pelos valores que me ensinaram, pelo sentido de responsabilidade e por tudo aquilo que abdicaram em prole da formação e educação dos filhos. Eu sei... e reconheço.

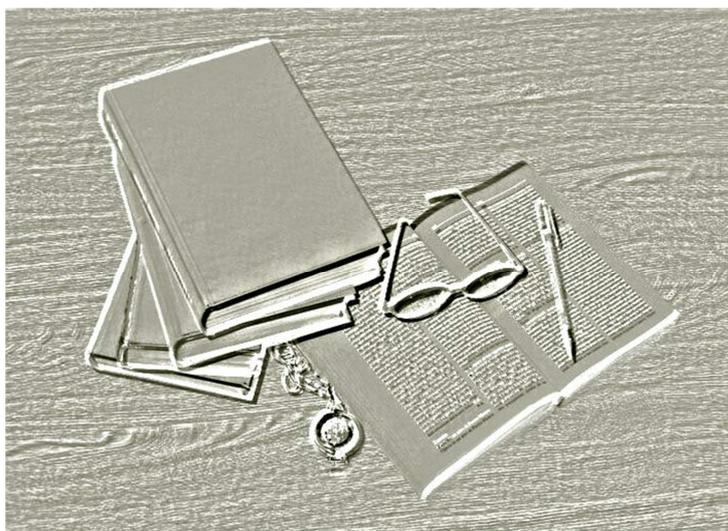
Ao meu marido por mais de dez anos de jornada conjunta, pelo seu apoio inabalável nas minhas decisões profissionais e por continuar a partilhar os seus sonhos comigo.

Ao meu irmão Filipe, por estar sempre ali bem pertinho, independentemente da distância física a que se encontra.

Aos meus avós, à minha madrinha e à Maria por constituírem parte do núcleo duro que sempre me sustenta nos momentos mais difíceis.

À minha filha, Nini, por me ter ensinado a forma mais sublime de amar. Por ti, querida, os grandes nadas e os pequenos tudos da vida valem a pena.

3. PREFÁCIO



3. PREFÁCIO

Durante a licenciatura em Medicina, o jovem estudante é ensinado a fazer diagnósticos e a estabelecer planos terapêuticos para as mais diversas patologias. Parece tarefa árdua, mas ainda assim apenas dependente da sapiência memorizada dos compêndios e da experiência adquirida posteriormente com a prática clínica.

Há no entanto casos, em que o conhecimento actual, o dos livros e o da experiência, não é capaz de oferecer respostas satisfatórias para aumentar a sobrevida ou melhorar a qualidade de vida dos doentes. É perante estes desafios que o médico não se deve resignar e deve prestar o seu contributo na procura de novas e melhores soluções. É perante estes desafios que o médico deve focalizar parte do seu tempo na investigação, não em detrimento dos doentes, mas em prole deles.

A hipertensão arterial pulmonar é uma entidade que se enquadra perfeitamente no exposto. Muito ainda falta saber sobre ela ... e um longo caminho ainda tem de ser percorrido até que se consiga travar a sua evolução progressiva e incapacitante.

Actualmente, as linhas de investigação desta doença estão orientadas no sentido de explorar a sua fisiopatologia de forma a encontrar as anomalias de sinalização molecular que iniciam e perpetuam a cascata de eventos subjacente à remodelação arteriolar. Acredita-se que um melhor conhecimento destes mecanismos permitirá encontrar novas moléculas-alvo, que possam ser utilizadas para fins terapêuticos.

Em 2008, por exemplo, dois estudos clarificaram a importância da endotelina-3 na vasoconstrição pulmonar e apresentaram uma nova proteína, a Fhl-1, como um elemento-chave no desenvolvimento da hipertensão pulmonar^{1,2}.

Novos fármacos estão também a ser explorados, representando uma esperança na melhoria do prognóstico sombrio desta patologia. O BAY-41-2272 (activador da guanilato ciclase solúvel), o BQ 123 (antagonista selectivo dos receptores da endotelina A) e o pinacidil (activador dos canais de potássio ATP-dependentes) têm vindo a demonstrar um desempenho favorável na diminuição das resistências periféricas, e poderão no futuro vir a ser incorporados nos protocolos terapêuticos³⁻⁵.

Estes trabalhos inovadores têm recorrido a diferentes modelos experimentais, quer *in vivo* quer *in vitro*, fazendo-se a escolha para um determinado estudo de acordo com as hipóteses colocadas e os objectivos estabelecidos.

Um conhecimento aprofundado destes modelos é pois indispensável para uma correcta interpretação e contextualização dos resultados obtidos.

Este trabalho de mestrado pretende ser um passo nesse sentido...

4. RESUMO



4. RESUMO

Introdução: A utilização de monocrotalina é, actualmente, um dos métodos mais utilizados pela comunidade científica para desenvolver um modelo animal de hipertensão pulmonar. Uma correcta interpretação dos resultados obtidos em determinado estudo implica a necessidade de monitorizar a progressão da doença e detectar sinais de elevação da pressão vascular pulmonar. Para este fim, tem-se recorrido à medição invasiva das pressões pulmonares por cateterismo ou, alternativamente, têm-se analisado as alterações histopatológicas que se desenvolvem nos órgãos-alvo.

Nos últimos anos, porém, a ecocardiografia tem surgido como um método de crescente interesse para a avaliação da função cardiovascular em diferentes modelos animais.

Objectivo: Pretendeu-se com este estudo compreender o papel da ecocardiografia na avaliação da hipertensão pulmonar experimental por monocrotalina. Para isso, avaliou-se a evolução de diferentes parâmetros ecocardiográficos ao longo do desenvolvimento da doença, relacionando-os com as alterações anatomo-patológicas desenvolvidas.

Material e métodos: Vinte e cinco ratos Wistar de 8 semanas foram injectados intraperitonealmente com monocrotalina (60 mg/kg) e distribuídos em três grupos diferentes (T1, T2 e T3). A avaliação dos parâmetros ecocardiográficos e anatomopatológicos foi efectuada às 2, 4 e 6 semanas, respectivamente, após a injeção de monocrotalina. Um grupo controlo constituído por 6 animais foi utilizado para comparação dos resultados.

Resultados: Os vários parâmetros ecocardiográficos analisados (o quociente tempo de aceleração/tempo de ejeção pulmonar, o índice de excentricidade do ventrículo esquerdo, o índice de desempenho miocárdico do ventrículo direito, a excursão sistólica do plano da tricúspide e o gradiente de pressões ventrículo direito/aurícula direita, na presença de insuficiência tricúspide) mostraram uma elevada correlação com o tempo de evolução da doença e com as alterações anatomo-patológicas analisadas.

Conclusões: A ecocardiografia é um método imagiológico que permite de forma não invasiva avaliar a progressão da hipertensão pulmonar no modelo de monocrotalina.

4. ABSTRACT

Introduction: Nowadays, the inclusion of monocrotaline in research protocols by the scientific community is common in order to induce pulmonary hypertension in experimental animals. The correct interpretation of the results obtained in particular studies implies the need for continued monitoring of disease progression and the detection of signs suggestive of raised pulmonary hypertension. This has been achieved through invasive means in which the pulmonary pressures are quantified by catheterism or, alternatively by analysing histopathological changes in target organs. However, over the past years, greater interest has been shown in echocardiography as a means of evaluating cardiovascular function in animal models.

Aims: Our aim was to evaluate the role of echocardiography in the pulmonary hypertension induced by monocrotaline. With this objective, different echocardiographic parameters were analysed over the disease progress and correlated with the pathological findings.

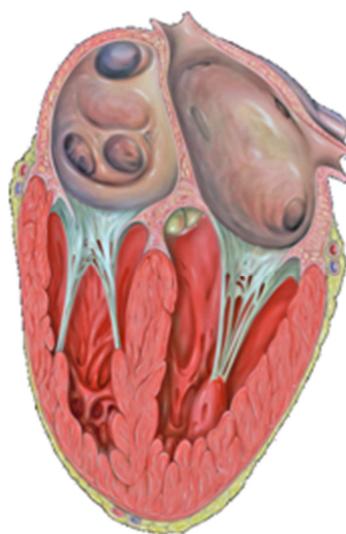
Methodology: Twenty five, 8 week old Wistar rats were injected intraperitoneally with monocrotaline (60mg/Kg) and were divided into 3 different groups (T1, T2, T3). The echocardiographic and pathological analysis were carried out at 2, 4 and 6 weeks post monocrotaline administration, respectively. A control group of six animals was used for result comparison.

Results: The set of echocardiographic parameters analysed (namely the ratio of pulmonary acceleration time to ejection time, the left ventricle eccentricity index, the right ventricular myocardial performance index, the tricuspid annular plane systolic excursion and the pressure

gradient between the right atrium and right ventricle, when tricuspid regurgitation is present) had a good correlation both with the time of disease progression and with the pathological findings.

Conclusions: Echocardiography is an imagiological method that permits the non invasive assessment of pulmonary hypertension progression in monocrotaline model.

5. INTRODUÇÃO



5. INTRODUÇÃO

5.1 – A HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

Definição

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é um **conceito hemodinâmico**, que se caracteriza por a nível arterial pulmonar, em situação basal, se registar uma pressão sistólica superior a 30 mmHg, ou uma pressão média superior a 25 mmHg. Em alternativa, pode-se considerar o quociente entre a pressão arterial pulmonar (PAP) sistólica e a pressão arterial sistémica sistólica, o qual se encontra patologicamente elevado (superior a 0,5). Em esforço, considera-se anormal uma pressão arterial pulmonar média superior a 30 mmHg. Independentemente do parâmetro usado, deve-se assegurar que a pressão de encravamento capilar pulmonar é inferior a 15 mmHg e que a resistência vascular pulmonar é superior a 3 Woods^{6,7}, correspondendo uma unidade Wood a 80 dyne.sec.cm⁻⁵.

Etiopatogénese

Na etiopatogénese da HAP, seja na forma idiopática ou na secundária a outras patologias e/ou factores de risco, há a contribuição

quer de **factores genéticos** quer de **factores ambientais**, como fármacos, vírus, tóxicos, hipoxia ou mesmo a inflamação.

O conceito – cada vez mais aceite – é que, sobre uma predisposição genética individual, a exposição a um determinado agente exógeno actua como factor desencadeante, originando uma sequência de eventos que conduzem ao desenvolvimento da vasculopatia arterial pulmonar com aumento das resistências vasculares. Este fenómeno de remodelação obstrutiva dos vasos arteriais envolve processos de vasoconstrição, proliferação celular, trombose e inflamação⁸.

Esta cascata é mediada por alterações que ocorrem quer a nível das **plaquetas**, com aumento da produção e libertação de serotonina, quer a nível de diferentes estruturas da parede arterial. No **endotélio**, verifica-se uma diminuição da síntese de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), com sobreexpressão concomitante de elementos vasoconstrictores como o tromboxano A₂ (Tx A₂) e endotelina -1 (ET-1). As células do **músculo liso** da camada média da artéria também são afectadas, com diminuição dos canais de potássio dependentes da voltagem e um aumento da síntese da fosfodiesterase, do transportador da serotonina e da angipietina-1. Na **adventícia**, aumenta a síntese de citocinas pró-inflamatórias e de proteínas da matriz (colagénio, elastina, tenascina-C e fibronectina), constatando-se uma hiperactividade de elastases e metaloproteases. Estas enzimas podem degradar diversos componentes da matriz extracelular, e conduzir a uma proliferação de células musculares lisas⁸.

relativamente frequente em certos grupos de risco, como por exemplo os doentes com anemia falciforme¹⁰ ou com esclerose sistémica¹¹.

Classificação

Em 2003, a Organização Mundial de Saúde promoveu a realização em Veneza do III Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar. Nesta reunião foi desenvolvida a mais recente classificação da hipertensão pulmonar, como resultado de um esforço de sistematização que agrupou formas com etiopatogenia, clínica, terapêutica e prognóstico semelhantes. Esta classificação considerou a existência de cinco grupos principais: a hipertensão arterial pulmonar, a hipertensão pulmonar secundária a patologia cardíaca esquerda, a hipertensão pulmonar secundária a pneumopatias e/ou hipoxémia, a hipertensão pulmonar devida a doença trombótica e/ou embólica crónica e miscelânea¹². O grupo 1 é ainda subdividido em vários subgrupos, como podemos ver na fig.2.

Diagnóstico

A detecção da hipertensão arterial pulmonar efectua-se geralmente numa fase tardia da doença. A dificuldade do diagnóstico resulta da evolução insidiosa da **sintomatologia** e da sua inespecificidade, mesmo em formas avançadas. A clínica caracteriza-se pelo seu carácter evolutivo, com progressão dos sintomas¹.

1. Hipertensão arterial pulmonar

- Idiopática
- Familiar
- Relacionada com factores de risco ou outras patologias:
 - Doenças do tecido conjuntivo
 - Cardiopatias congénitas (*shunt* esquerdo-direito ou sistémico-pulmonar)
 - Hipertensão portal
 - Vírus da imunodeficiência humana
 - Fármacos e tóxicos
 - Outras
- Associada a doença microvascular e/ou venosa significativa:
 - Doença veno-oclusiva pulmonar
 - Hemangiomatose capilar pulmonar
- Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido

2. Hipertensão pulmonar secundária a patologia cardíaca esquerda

3. Hipertensão pulmonar associada a pneumopatias e/ou hipoxémia

4. Hipertensão pulmonar devida a doença trombótica e/ou embólica crónica

5. Miscelânea

Fig.2- Classificação da hipertensão pulmonar de acordo com a etiologia.

Na HAP podemos identificar as seguintes fases: **fase preclínica** que corresponde a um período em que o indivíduo se mantém assintomático ou, apenas manifestando astenia e/ou dispneia para

grandes esforços; o diagnóstico nesta fase é feito sobretudo nos indivíduos pertencentes a um grupo de risco; **-fase sintomática** mas relativamente estável, na qual, se bem que haja uma redução progressiva da capacidade de exercício, o doente mantém-se estável em repouso; os doentes podem apresentar pré-síncope ou síncope de esforço pela incapacidade de aumentar o débito cardíaco em exercício; a dor torácica por angina de peito atribui-se geralmente à isquémia ventricular direita; palpitações e tosse podem também estar presentes; **- fase de deterioração progressiva**, coincidindo com a insuficiência do ventrículo direito e a queda do débito cardíaco em situação basal; o doente apresenta clínica de congestão venosa com hepatomegália, ascite e edemas; a morte pode ser o culminar do processo.

Do ponto de vista funcional, os doentes com HAP são classificados segundo um sistema muito semelhante ao desenvolvido pela *New York Heart Association* (NYHA) para a insuficiência cardíaca crónica, mas com algumas modificações propostas pela Organização Mundial de Saúde (OMS)^{6,13}.

O perfil de sintomatologia apresentado e o impacto da clínica na vida do doente permitem a atribuição de uma classe (I a IV) que reflecte a gravidade da HAP – a classe I corresponde a uma fase inicial, enquanto a fase IV traduz a forma mais avançada da doença (figura 3).

O **exame objectivo** pode também fornecer alguns dados indicadores de HAP ou da patologia que lhe está subjacente. Os sinais físicos mais frequentes são atribuíveis a¹⁴ pressão arterial pulmonar aumentada, a insuficiência cardíaca direita ou a baixo débito cardíaco.

Classe I:	Doentes com HAP sem limitação da actividade física. A actividade física normal não causa dispneia, fadiga, dor torácica, ou pré-síncope.
Classe II:	Doente com HAP com ligeira limitação da actividade física. Os doentes encontram-se bem em repouso. A actividade física normal causa dispneia, fadiga, dor torácica ou episódios pré-síncope.
Classe III:	Doentes com HAP com marcada limitação da actividade física. Os doentes estão cómodos em repouso. A actividade física, incluindo a menos intensa provoca dispneia, fadiga, dor torácica ou episódios pré-síncope.
Classe IV:	Doentes com HAP com incapacidade para levar a cabo qualquer actividade física sem apresentar sintomas. Os doentes apresentam sinais de insuficiência cardíaca direita. Podem apresentar dispneia e/ou fadiga incluindo em repouso. A sensação de mau estar aumenta com qualquer actividade física.

Fig.3- Tabela com a classificação da hipertensão arterial pulmonar segundo a capacidade funcional do doente de acordo com a NYHA/OMS.

A pressão arterial pulmonar aumentada está associada geralmente a: um impulso sistólico palpável no bordo esquerdo do esterno provocado pela contracção vigorosa do ventrículo direito hipertrofiado; um reforço da componente pulmonar do segundo som cardíaco; um *click* sistólico precoce audível no foco pulmonar; um sopro mesossistólico devido à passagem turbulenta do sangue pela válvula

pulmonar; um sopro pansistólico resultante da insuficiência tricúspide e um sopro diastólico decorrente da insuficiência pulmonar.

Os sinais de insuficiência cardíaca direita estão presentes numa fase mais avançada da doença e englobam o ritmo de galope, o engurgitamento jugular, a hepatomegália, a ascite e os edemas periféricos.

A hipotensão com diminuição da pressão de pulso e extremidades frias é resultado de um baixo débito cardíaco e é indicador de mau prognóstico.

Como meios complementares de diagnóstico, a telerradiografia do tórax e o electrocardiograma podem apoiar o diagnóstico de hipertensão arterial pulmonar, ou podem fazer suspeitá-la.

A **telerradiografia do tórax** pode mostrar uma dilatação do tronco arterial pulmonar e seus principais ramos, o que contrasta com a hipertransparência periférica do parênquima pulmonar (aspecto em “árvore podada”), resultante da obstrução dos vasos arteriais de menor calibre. O alargamento das cavidades direitas pode traduzir-se numa cardiomegália¹⁴ (figura 4).

O **electrocardiograma** apresenta frequentemente sinais de hipertrofia ou sobrecarga de pressão ventricular direita e dilatação da aurícula direita¹⁵, que se traduzem por: desvio direito do eixo eléctrico; ondas P altas (superior a 2,5 mm) em DII, DIII e aVF; padrão de bloqueio incompleto do ramo direito; onda R superior a S em V₁; padrão

qR em V₁; onda R inferior a S em V₅ ou V₆ e alterações da repolarização nas derivações precordiais direitas (figura 5).



Fig.4 – Telerradiografia do tórax de uma criança de 3 anos com hipertensão arterial pulmonar idiopática. É possível observar a cardiomegália e o padrão de centralização da vasculatura pulmonar.

A **ecocardiografia 2D-Doppler** oferece actualmente múltiplas vantagens no diagnóstico e seguimento das mais diversas cardiopatias. Uma abordagem detalhada da utilidade deste método na HAP será efectuada na secção 5.4.

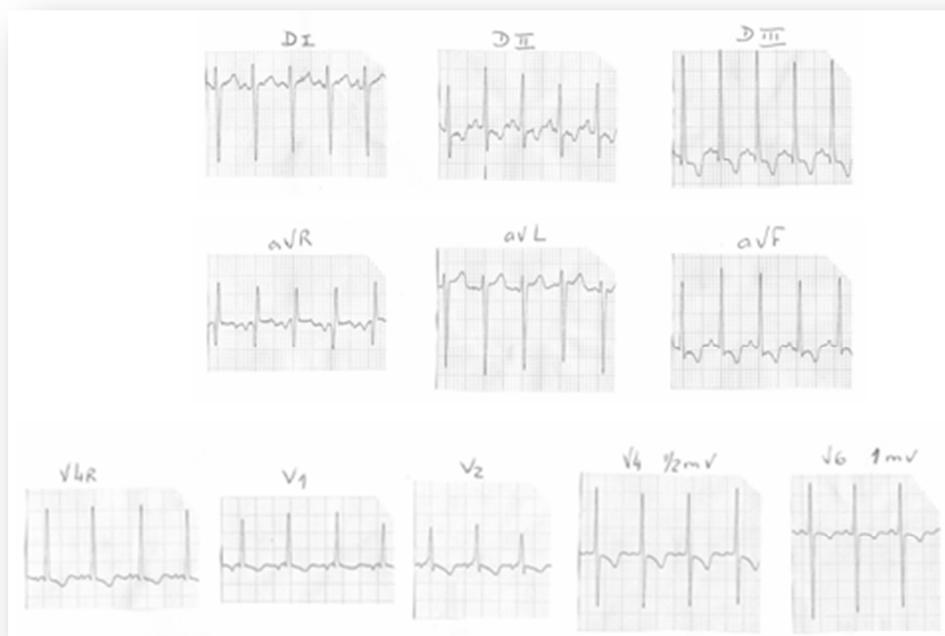


Fig. 5 – Electrocardiograma de 12 derivações da mesma criança com HAP idiopática. É visível o desvio direito do eixo eléctrico, assim como critérios de hipertrofia ventricular direita. Presença de ondas P altas em DII, DIII e aVF.

O **cateterismo cardíaco** direito permanece contudo como o *gold standard* no diagnóstico desta doença. De facto, é a única técnica que possibilita: a medição directa das pressões arteriais pulmonares; a determinação dos débitos cardíacos pelo método de Fick; a avaliação da pressão capilar de encravamento pulmonar, para eventual identificação de patologia cardíaca esquerda ou doença obstrutiva venosa pulmonar; o cálculo das resistências vasculares pulmonares; a realização de angiografias para melhor caracterização morfológica, por exemplo, de eventuais *shunts* esquerdo-direitos (comunicação

interventricular, persistência do canal arterial,...); a avaliação da vasoreactividade do leito vascular pulmonar, permitindo inferir sobre o potencial de resposta ao tratamento com antagonistas dos canais de cálcio.

Uma vez realizado o diagnóstico de hipertensão pulmonar, é necessário tentar caracterizá-la e identificar a sua causa. Para isso, utiliza-se uma série de técnicas que devem ser realizadas escalonadamente, conforme a informação obtida em cada uma delas¹⁶.

Telerradiografia do tórax	<ul style="list-style-type: none">• DPOC• Pneumopatia intersticial• Doença veno-oclusiva pulmonar• Anomalias da caixa torácica
Gasometria arterial	
P. de função respiratória	
TAC de alta resolução	
Biópsia pulmonar	
Oximetria nocturna	<ul style="list-style-type: none">• Síndrome de apneia do sono
Estudo do sono	
Cintigrafia V/Q	<ul style="list-style-type: none">• Tromboembolismo pulmonar
TAC helicoidal	
Avaliação laboratorial	<ul style="list-style-type: none">• Doenças autoimunes• Alterações da coagulação• Disfunção tiroideia• Sida, Hepatite B e C
Prova de esforço	

Fig.6 – Exames complementares de diagnóstico utilizados na caracterização da hipertensão pulmonar. DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crónica; SIDA – Síndrome de Imunodeficiência adquirida. P. de função respiratória – provas de função respiratória; TAC – tomografia axial computadorizada; V/Q – ventilação/perfusão.

Terapêutica

O tratamento convencional da hipertensão arterial pulmonar, aplicável a qualquer uma das suas formas, engloba¹⁷ alterações do estilo de vida, oxigenoterapia, administração de diuréticos e anticoagulantes orais.

As **alterações do estilo de vida** têm a ver com a adequação da intensidade do esforço às possibilidades físicas do doente. A prática de desporto de alta competição está contraindicada, independentemente da fase de evolução da doença. No caso das mulheres, a gravidez também está contraindicada, pelo que deve haver aconselhamento relativamente ao meio anticoncepcional mais adequado a usar. Precauções devem também ser tomadas no sentido de prevenir a ocorrência de infecções respiratórias, assim como evitar situações que condicionem uma redução significativa da volémia. A **oxigenoterapia** deve ser considerada quando as saturações de O₂ são inferiores a 90%.

A administração de **diuréticos** deve ser equacionada sempre que estiverem presentes sinais de congestão venosa. É porém necessário encontrar a dose mais adequada de forma a evitar uma depleção exagerada de fluidos e sais com conseqüente redução do débito cardíaco e hipotensão arterial sistémica.

O recurso à **digoxina** deve ser ponderado, sobretudo se houver fibrilhação auricular associada. Preserva-se assim o contributo da contração auricular para o enchimento ventricular e consegue-se manter uma frequência cardíaca apropriada. Associadamente, a acção inotrópica positiva da digoxina pode também ter efeito benéfico.

Os **anticoagulantes orais** podem ser necessários para diminuir a tendência protrombótica presente nos portadores de HAP. As doses administradas são as necessárias para obter um INR (Índice Internacional Normalizado) entre 1,5 e 2,5. Diminui-se assim o risco de trombose *in situ* da vasculatura pulmonar, o que poderia contribuir para a progressão da doença.

Até há poucos anos, o tratamento da HAP era baseado essencialmente nas medidas gerais de suporte descritas, dado que as opções farmacológicas específicas eram praticamente inexistentes. Actualmente, dispõe-se contudo de novos fármacos que demonstraram^{18,19} em estudos controlados e randomizados, ter propriedades vasodilatadoras e anti-proliferativas da vasculatura pulmonar:

Os **bloqueadores dos canais de cálcio** devem ser utilizados em doses elevadas na minoria de doentes (cerca de 10%) que tem um teste de vasorreactividade positivo.

O uso de outros fármacos, como os **análogos da prostaciclina**, nomeadamente o epoprostanol, os **antagonistas dos receptores da endotelina** (bosentan) e os **inibidores da fosfodiesterase 5** (ex. sildenafil) deve ser considerado nos doentes com um teste de vasorreactividade negativo ou nos doentes tratados com bloqueadores dos canais de cálcio, mas que mantêm uma classe funcional de III ou IV da NYHA/OMS.

Em última instância, pode-se recorrer à **atrioseptostomia** como procedimento paliativo que assegura o débito cardíaco em caso de crise

hipertensiva. O **transplante pulmonar** é também uma alternativa, embora as taxas de sucesso ainda não sejam muito animadoras.

5.2 – MODELO EXPERIMENTAL

Vários modelos experimentais de hipertensão pulmonar estão descritos na literatura. A maioria recorre à hipoxia²⁰, ao hiperfluxo pulmonar^{21,22}, à embolização de ar^{23,24}, à irradiação torácica²⁵, ou à administração de certas toxinas²⁶, como meio de elevar as pressões pulmonares.

Independentemente do mecanismo utilizado e das especificidades ou vantagens inerentes a cada modelo, o recurso à monocrotalina têm-se generalizado e assumido como um dos métodos preferenciais para induzir hipertensão pulmonar nos pequenos roedores. A fácil execução técnica e a estreita semelhança fisiopatológica com a hipertensão pulmonar humana estão na base desta aceitação.

Modelo de hipertensão pulmonar com monocrotalina

A monocrotalina é um alcalóide pirrolizidínico, obtido a partir das folhas e grãos de uma planta autóctone das regiões tropicais e subtropicais, a *Crotalaria spectabilis*.

É usado frequentemente para induzir HAP em modelos experimentais com ratos e ratinhos. Consiste na injeção intraperitoneal de 0,5 ml de solução contendo 60 mg/kg de monocrotalina. Esta

administração é única e após 2 a 3 semanas, já há sinais evidentes de HAP.

A HAP produzida pela monocrotalina nos animais de experimentação tem significativas semelhanças com a HAP humana²⁷ quer pela sua gravidade hemodinâmica (pressões arteriais pulmonares sistólicas na ordem dos 60 a 110 mmHg) que está associada a uma elevada mortalidade, quer pelas alterações histopatológicas presentes (hipertrofia da média e da adventícia e necrose fibrinoide). No entanto, a HAP provocada pela monocrotalina tem duas particularidades: a lesão primária acarreta uma perda precoce da barreira endotelial, com o consequente edema pulmonar de permeabilidade; o processo está associado a inflamação significativa a nível da adventícia. Este último aspecto justifica a eficácia dos corticoesteróides e outros agentes anti-inflamatórios no tratamento desta HAP. Uma descrição mais pormenorizada dos aspectos anatomo-patológicos deste modelo será efectuada na secção 5.3.



Fig.7 – Foto da planta *Crotalaria spectabilis*, retirada respeitando os direitos de autor, do website: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Crotalaria_spectabilis.JPG; autor: SunshinestateOfMind.

Do ponto de vista bioquímico, a HAP por monocrotalina é mediada por mecanismos fisiopatológicos semelhantes aos descritos anteriormente, com síntese aumentada das proteínas da matriz; sobreexpressão da serotonina e das metaloproteases e subexpressão dos canais de potássio dependentes da voltagem. Diferencia-se contudo pelo componente inflamatório extremamente marcado, em que estão envolvidas várias citocinas (Interleucina-1 β , interleucina-6, MCP1, ICAM-1, selectina-E e TGF- β) e pela diminuição da expressão da endotelina-1.

Importa ainda referir que a monocrotalina, para além dos efeitos pulmonares, causa também genototoxicidade e citotoxicidade em outros

órgãos, nomeadamente no fígado. Esta actuação é mediada pelo seu metabolito, a dehidromonocrotalina, que condiciona uma inibição da NADH desidrogenase, comprometendo a síntese de ATP e, conseqüentemente, todo o metabolismo.

Uma última nota para salientar a importância que este modelo experimental tem tido nas últimas décadas. De facto, muito do conhecimento científico que hoje detemos relativamente à hipertensão arterial pulmonar, foi fundamentado a partir da hipertensão induzida pela monocrotalina.

Uma pesquisa rápida permite encontrar várias publicações em que o modelo foi utilizado para comprovar não só o papel determinante de certas moléculas na evolução da HAP, mas também demonstrar a capacidade de certas substâncias atenuarem o curso da doença²⁸⁻³³.

5.3 – A ANATOMO-PATOLOGIA NA HIPERTENSÃO PULMONAR POR MONOCROTALINA

No modelo de monocrotalina, o **pulmão** é um dos órgãos mais atingidos, mostrando sinais de remodelação vascular e **lesão parenquimatosa**.³⁴

Uma das alterações mais precoces, identificável nos primeiros dias após a administração da monocrotalina, é o espessamento das paredes alveolares por congestão capilar e edema intersticial. À medida que o edema intersticial progride, os alvéolos e os sacos alveolares são

preenchidos por exsudato seroso e serofibrinoso. Em fases mais tardias da pneumotoxicidade pela monocrotalina, os sacos alveolares são preenchidos por fibrina, hemorragia ou restos celulares. Este fenómeno é acompanhado de infiltração mononuclear, o que atribui um aspecto hiper celular ao interstício. Os macrófagos alveolares aumentam em número e tamanho, adquirindo um aspecto esponjoso. Encontram-se também aspectos de metaplasia epitelial alveolar.

Os **vasos arteriais pulmonares** são também alvo de um processo de remodelação que atinge as suas três camadas.

A nível da **íntima**, as células endoteliais tornam-se edemaciadas, com os núcleos a fazerem protusão para o lúmen e com expansões citoplasmáticas que se dirigem para o interior do vaso. É também frequente a ocorrência de trombos compostos por fibrina, eritrócitos, leucócitos, plaquetas e/ou restos celulares. Todas estas lesões contribuem para um certo grau de oclusão do lúmen arterial. A reestruturação descrita afecta sobretudo o leito capilar e as arteríolas, sendo particularmente evidente entre a 1^a e a 2^a semana após a administração da monocrotalina. No entanto, o carácter progressivo da lesão, faz com que o processo se estenda a todos os níveis da vasculatura pulmonar. É de notar que na HAP provocada por monocrotalina, não se observa lesões plexiformes ou esclerose da íntima, aspectos típicos de algumas formas de HAP humana.

Na camada **média**, o processo de remodelação ocorre geralmente após a existência de lesões a nível endotelial. Caracteriza-se por uma hipertrofia / hiperplasia de camadas concêntricas do

músculo liso e por uma extensão deste músculo a artérias geralmente não muscularizadas.

Na **adventícia**, identifica-se inicialmente um edema perivascular com reduzido número de células inflamatórias. A gravidade das alterações morfológicas torna-se progressivamente mais evidente com o acentuar do infiltrado inflamatório, proliferação de fibroblastos, deposição de colagénio, edema proteináceo com fibrina abundante e hemorragia.

O **coração** desenvolve também algumas adaptações à sobrecarga decorrente das pressões arteriais pulmonares aumentadas (figura 8). O septo interventricular e a parede livre do ventrículo direito sofrem um processo de hipertrofia com aumento da síntese proteica, em particular de colagénio, e aumento do tamanho dos miócitos, quer longitudinalmente, quer transversalmente.

Em fases mais tardias da doença, a falência do miocárdio leva a um alargamento das cavidades direitas. Durante todo o processo as cavidades esquerdas permanecem mais ou menos preservadas.

Menos frequentemente pode se encontrar pequenos focos hemorrágicos ou de degeneração miocárdica, acompanhados de infiltração mononuclear. Estas lesões, à semelhança da hipertrofia, surgem apenas no septo interventricular ou na parede livre do ventrículo direito.

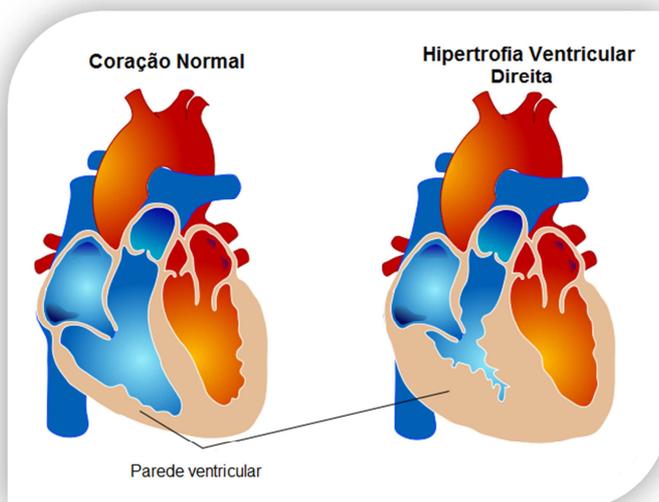


Fig.8 - Esquema representativo da hipertrofia ventricular. Imagem modificada a partir de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Right_Ventricular_hypertrophy.svg, de acordo com os direitos de autor; autor: Mariana Ruiz.

5.4 – A ECOCARDIOGRAFIA NA HIPERTENSÃO PULMONAR

A ecocardiografia é uma técnica imagiológica que oferece inúmeras vantagens no contexto do diagnóstico e seguimento dos doentes com HAP. De facto, trata-se de um exame não invasivo e sem complicações associadas, mas que ainda assim consegue fornecer informação importante relativamente à morfologia e função do coração, estimar de forma relativamente fiável os valores da pressão arterial pulmonar sistólica/diastólica e avaliar alguns parâmetros ecocardiográficos com implicações no prognóstico³⁵. O estudo ecocardiográfico completo deve incluir imagens bidimensionais e modo

M das incidências mais importantes, traçados de Doppler dos diferentes fluxos sanguíneos e imagens com Doppler de cor.

As imagens bidimensionais representam “cortes” do coração segundo o plano em que este órgão é atravessado pelo feixe de ultrassons (figura 9). O diferente posicionamento e inclinação da sonda permite a observação do órgão em várias incidências.³⁶

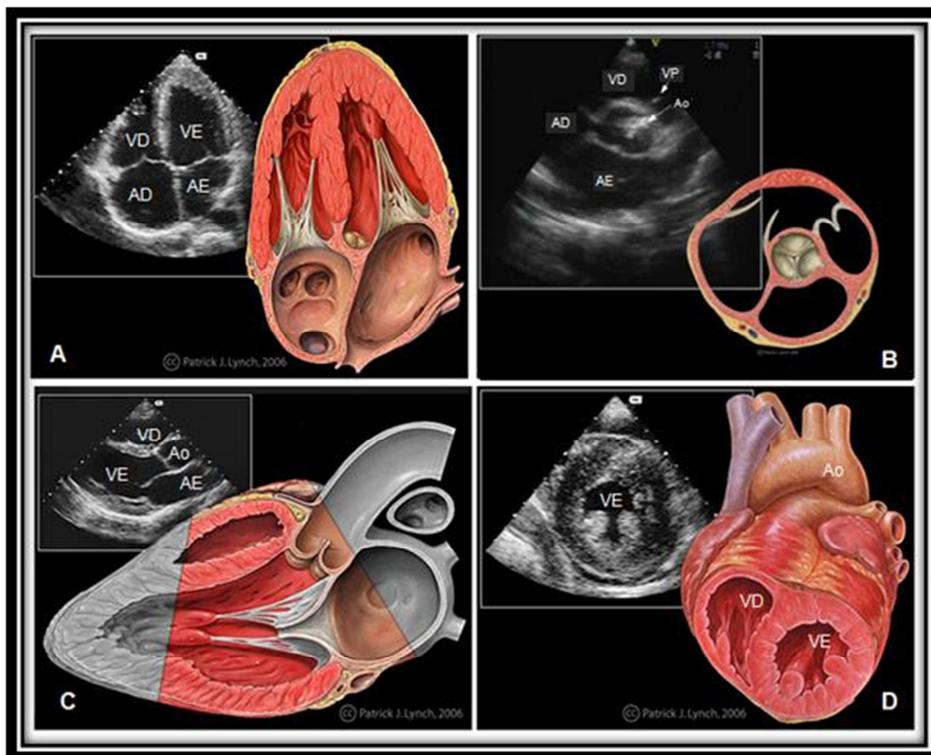


Fig. 9 – Representação esquemática das principais incidências ecocardiográficas, com a respectiva imagem bidimensional apresentada no canto superior esquerdo. A – Incidência apical; B – Eixo curto de vasos; C – Eixo longo; D – Eixo curto de ventrículos. AD – Aurícula Direita. VD- Ventrículo Direito. AE – Aurícula Esquerda. Ao – Aorta. VP – válvula pulmonar Adaptado de imagens de Patrick J. Lynch, respeitando os direitos de autor.

Nos doentes com HAP sintomática, as imagens bidimensionais podem revelar **sinais indirectos de pressões pulmonares elevadas** como o alargamento das cavidades direitas, o abaulamento do septo interauricular para a esquerda, a hipertrofia e a diminuição da função contráctil do ventrículo direito, a presença de derrame pericárdico, assim como o aumento da espessura e movimento paradoxal do septo interventricular (figura 10). De facto, na HAP o septo interventricular costuma apresentar-se rectificadado durante a sístole, ou até mesmo fazer proclência na cavidade ventricular esquerda, dependendo do gradiente de pressões que se estabelecem entre as duas cavidades ventriculares. O ventrículo esquerdo adquire por isso a forma de “D”, com diminuição do volume ventricular, mas mantendo a função sistólica global.³⁷



Fig.10 – Imagem ecocardiográfica de uma criança de 3 anos com hipertensão arterial pulmonar idiopática. Nesta incidência subcostal, observa-se uma dilatação acentuada das cavidades direitas, com abaulamento do septo interauricular para a esquerda e hipertrofia ventricular direita.

O **índice de excentricidade** traduz esta deslocação do septo interventricular no decorrer do ciclo cardíaco. Calcula-se a partir do quociente $D1/D2$, sendo D1 o eixo máximo do ventrículo esquerdo paralelo ao septo e D2 o eixo máximo que lhe é perpendicular.

Um índice de excentricidade superior a um no final da diástole representa sobrecarga de volume ventricular direita. Um valor elevado simultaneamente na telessístole e na telediástole implica sobrecarga de pressão e é marcador de prognóstico.^{38,39}

Um outro importante parâmetro de prognóstico, que pode ser avaliado em imagens bidimensionais e nas imagens em modo M, é a **excursão sistólica do plano da tricúspide (TAPSE)**⁴⁰. Ela avalia a função sistólica do ventrículo direito, pois mede o grau de encurtamento do eixo longo do ventrículo, resultante do movimento do anel da tricúspide em direcção ao ápex, em sístole.

A associação das imagens bidimensionais ao Doppler (contínuo, pulsado e de cor) permite adquirir mais informação e até estimar com alguma fidedignidade os valores da pressão sistólica arterial pulmonar (PSAP)⁴¹.

A **PSAP** é determinada apenas nos doentes que têm insuficiência tricúspide, dado que ela pressupõe o registo da velocidade máxima do fluxo regurgitante (v). Recorre-se depois à fórmula modificada de Bernoulli ($\Delta P = 4v^2$), para calcular o gradiente sistólico máximo de pressões entre o ventrículo direito e a aurícula direita (ΔP). A este valor é adicionada a pressão auricular direita, inferida a partir do grau de engurgitamento jugular. Obtém-se assim a pressão sistólica do

ventrículo direito que é igual à pressão arterial pulmonar sistólica, se não existir estenose pulmonar.

A avaliação por Doppler contínuo do fluxo pulmonar de um doente com HAP tem também características particulares, nomeadamente uma redução do tempo de aceleração e o aparecimento, em fases avançadas de uma incisura sistólica.

Para além do índice de excentricidade, o **índice de desempenho miocárdico do ventrículo direito** ou índice de Tei do ventrículo direito deve também ser calculado. Ele permite avaliar a função global (sistólica e diastólica) deste ventrículo, obtendo-se assim um outro parâmetro indicador de prognóstico. É geralmente referido como RIMP, abreviatura que vem da sua designação anglo-saxónica *Right Index of Myocardial Performance*.

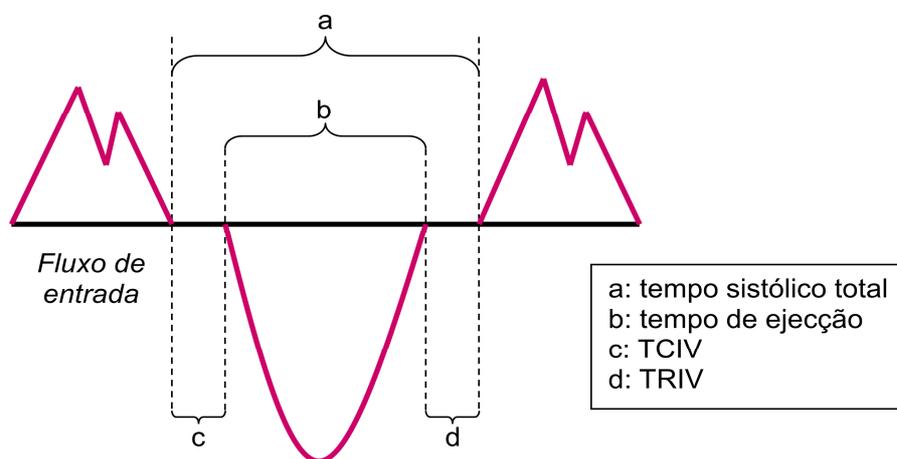


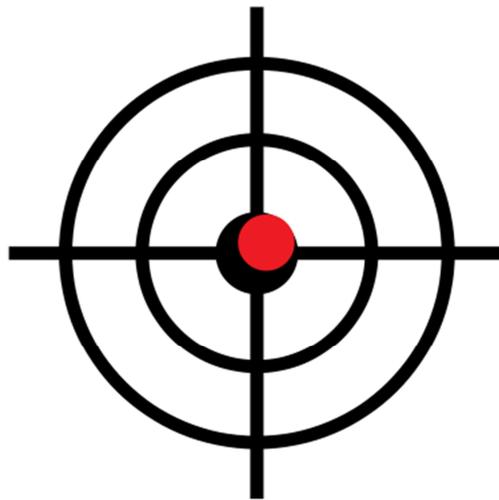
Fig. 11 – Tempos do ciclo cardíaco utilizados no cálculo do RIMP: tempo sistólico total (Tsist), tempo de ejeção (Tej), tempo de contracção isovolumétrica (TCIV), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

O cálculo do RIMP é efectuado por:

$$\text{RIMP} = (\text{TCIV} + \text{TRIV}) / \text{Tej} = (\text{Tsist} - \text{Tej}) / \text{Tej}$$

Por último, devemos referir que durante o estudo ecográfico é também possível identificar ou excluir cardiopatias que possam ser a causa de hipertensão pulmonar. Referimo-nos sobretudo a patologias cardíacas esquerdas, como é o caso da estenose mitral, ou a cardiopatias congénitas que condicionam um shunt esquerdo-direito.

6. OBJECTIVOS



6. OBJECTIVOS

Actualmente, o recurso à monocrotalina é um dos métodos mais utilizados pela comunidade científica para induzir hipertensão pulmonar em animais experimentais.

Este trabalho teve como objectivo compreender o papel da ecocardiografia na monitorização da evolução da doença neste modelo. Para isso, avaliou-se o comportamento de diferentes parâmetros ecocardiográficos, relacionando-os com as alterações anatomopatológicas desenvolvidas. Pretendeu-se assim verificar se a ecocardiografia poderia ser utilizada em futuros estudos para inferir de forma não invasiva o grau de hipertensão pulmonar.

7. MATERIAL E MÉTODOS



7. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo experimental decorreu no Instituto de Biofísica/Biomatemática da Faculdade de Medicina, no Instituto de Patologia Experimental, bem como no Biotério da Faculdade de Medicina. As orientações referidas pela Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro e pela Portaria nº 1131/97 de 7 de Novembro foram respeitadas, com a aprovação da Direcção Geral de Veterinária (Divisão de Bem-Estar Animal).

Resumo do procedimento experimental

No estudo usaram-se 31 ratos *Wistar*, sexo masculino, com 8 semanas de idade. Os ratos foram mantidos sob condições de temperatura e humidade constantes, ciclos de luz de 12 horas escuro/luz e foi-lhes fornecida comida e água *ad libitum*.

Estes ratos foram subdivididos em um grupo controlo (GC) e três grupos teste (T1, T2, T3). Nos grupos teste, injectou-se intraperitonealmente uma solução de monocrotalina (MCT). Os grupos GC, T1 e T2 eram constituídos por 6 animais; optou-se por utilizar 13 ratos em T3 dada a elevada mortalidade esperada para este grupo. Todos os animais foram submetidos a ecocardiografia transtorácica, seguida de sacrifício do animal e estudo anatomopatológico.

O quadro esquematiza a calendarização dos procedimentos nos diferentes grupos:

Grupo	Número de animais	Injecção MCT	Ecocardiografia	Sacrifício
GC	6	---	Dia 1	Dia 1
T1	6	MCT	Dia 14	Dia 14
T2	6	MCT	Dia 28	Dia 28
T3	13	MCT	Dia 42	Dia 42

Preparação do modelo experimental

Para indução deste modelo de hipertensão pulmonar, preparou-se uma solução de monocrotalina na concentração de 30 mg/ml. Usou-se para o efeito 600 mg de *Crotaline Sigma* que foram diluídos em 4 ml de HCl 1M. A mistura foi homogeneizada com o auxílio da acção de ultrassons durante um minuto. De seguida, adicionaram-se 3 ml de água destilada e o pH foi ajustado com NaOH 1 M para um pH de 7,2 a 7,4. O pH foi estimado através de fitas colorimétricas. Procedeu-se depois à diluição da solução com água destilada até se obter um volume final de 20 ml.

A cada animal dos grupos teste foi aplicada por via intraperitoneal, uma dose única da solução de monocrotalina, sendo o volume a administrar dependente da massa do animal (60 mg de MCT/kg). Para a injecção intraperitoneal, usaram-se agulhas de calibre 25G e seringas de 1 ml.

Avaliação global

Os animais dos quatro grupos foram observados semanalmente e sujeitos a uma apreciação global de eventuais sinais clínicos de hipertensão pulmonar.

Protocolo anestésico

A anestesia dos animais foi sempre efectuada antes da realização de ecocardiografia e do sacrifício.

Consistiu na administração intramuscular de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg).

Protocolo ecocardiográfico

Foi usado um ecógrafo GE Vivid I com sonda de 15 MHz; uma sonda de 5 MHz foi utilizada para a avaliação da insuficiência tricúspide em Doppler.

Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal ou lateral esquerdo sobre uma superfície horizontal. A pele do hemitórax anterior esquerdo foi tricotomizada e aplicado um gel acústico entre o transdutor e o local de exame. A sonda do ecógrafo foi então orientada de forma a obter imagens bidimensionais das diferentes incidências: “apical”, “eixo longo”, “eixo curto de vasos”, “eixo curto de ventrículos” e “supraesternal”. Os traçados de modo M e de Doppler foram registados a uma velocidade de 200 mm/s.

Medições efectuadas em modo M ou bidimensional:

Em eixo curto de ventrículos, abaixo do nível da válvula aórtica, foi obtido o índice de excentricidade através da medição dos dois diâmetros do ventrículo esquerdo (D1 e D2). Adquiriram-se valores na telessístole e na telediástole.

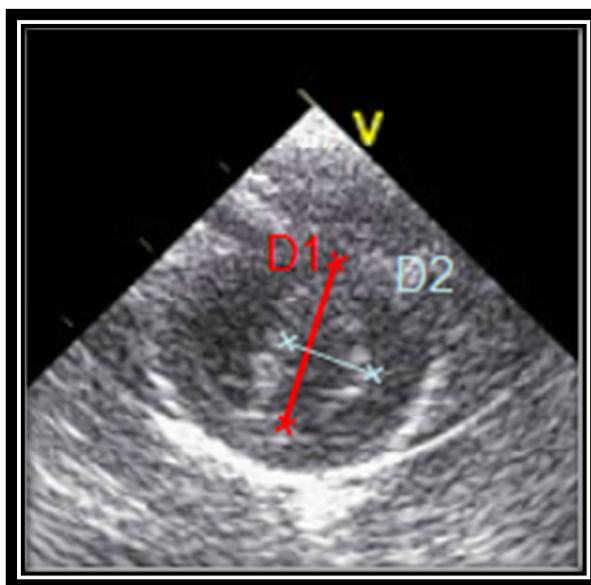


Fig. 12 – Imagem ecocardiográfica em eixo curto de ventrículos, com a medição de D1 e D2 para cálculo do índice de excentricidade.

Na incidência de quatro câmaras, aplicou-se o modo M, de forma que a linha do cursor atravessasse a inserção lateral da válvula tricúspide no seu anel. O valor da TAPSE é calculado como a distância percorrida pelo anel da tricúspide entre o final da diástole e o fim da sístole. Este valor foi expresso como uma percentagem do eixo ventricular direito em telediástole.

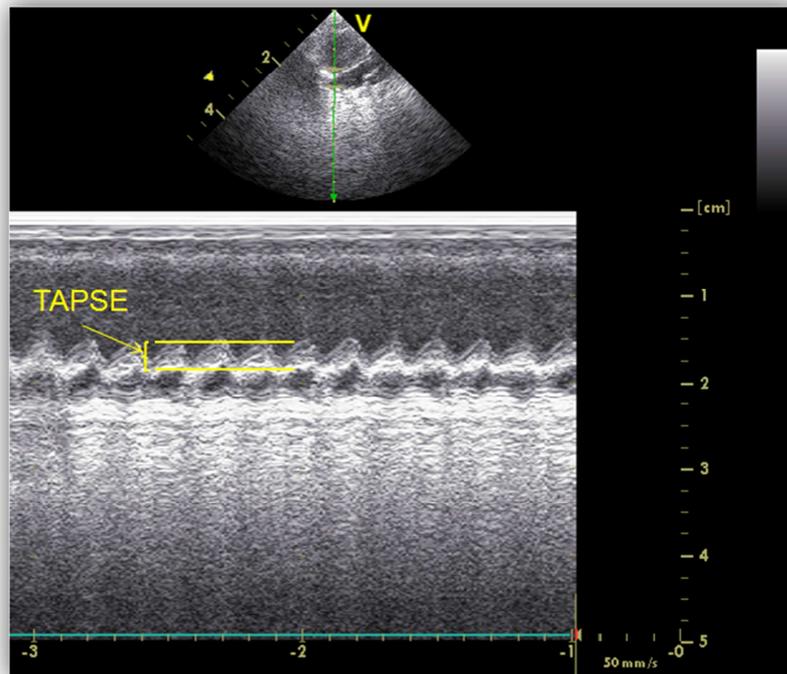


Fig. 13 – Imagem ecocardiográfica em que se mostra a medição da TAPSE.

Medições efectuadas em Doppler.

O Doppler pulsado foi posicionado no tracto de saída do ventrículo direito, proximalmente aos folhetos da válvula pulmonar. A orientação da sonda foi colocada de forma a maximizar o fluxo laminar em incidência de eixo curto de vasos. Para além de se caracterizar o envelope do fluxo de saída a nível pulmonar, procurando a existência de uma incisura sistólica, avaliou-se também os seguintes parâmetros: tempo de aceleração do fluxo pulmonar, tempo de ejeção e o

quociente destas duas variáveis. O tempo de aceleração foi medido desde o início do fluxo sistólico pulmonar até ao pico de velocidade desse mesmo fluxo. O tempo de ejeção foi medido como o tempo que decorreu desde o início até ao término do fluxo sistólico pulmonar (figura 14).

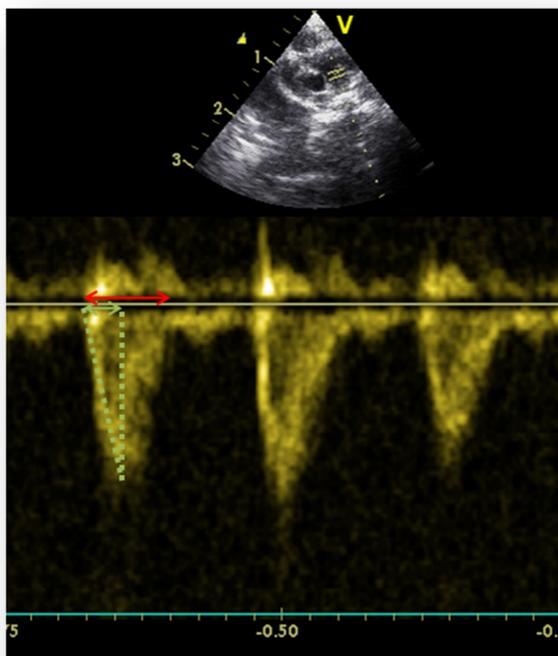


Fig. 14 – Doppler pulsado do fluxo pulmonar, mostrando a medição do tempo de aceleração (a amarelo) e o tempo de ejeção (a vermelho).

O Índice de Desempenho Miocárdico do Ventrículo Direito (RIMP) é calculado, recorrendo ao tempo de ejeção pulmonar medido no traçado de Doppler do fluxo pulmonar, e o tempo total de sístole do

ventrículo direito. O segundo parâmetro é obtido, colocando o Doppler na câmara de entrada do ventrículo direito e considerando o intervalo de tempo entre a paragem do fluxo através da tricúspide devido ao encerramento valvular e o recomeço do fluxo no ciclo cardíaco seguinte após a reabertura da válvula.

A presença e grau da insuficiência tricúspide foi avaliada recorrendo a Doppler de cor e Doppler contínuo na incidência de quatro câmaras. Quando se observou regurgitação, a sonda foi então alinhada de forma a obter-se o pico máximo de velocidade. O gradiente sistólico de pressões ventrículo direito/aurícula direita (ΔP) foi calculado usando o pico de velocidade da insuficiência tricúspide (v), recorrendo à equação modificada de Bernoulli ($\Delta P = 4v^2$).

Todos os valores ecocardiográficos apresentados correspondem a médias de 3 medições.

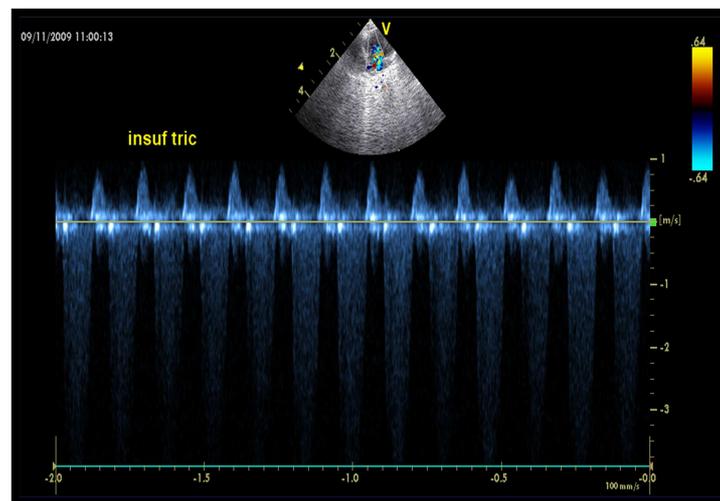


Fig.15 – Doppler contínuo de insuficiência tricúspide.

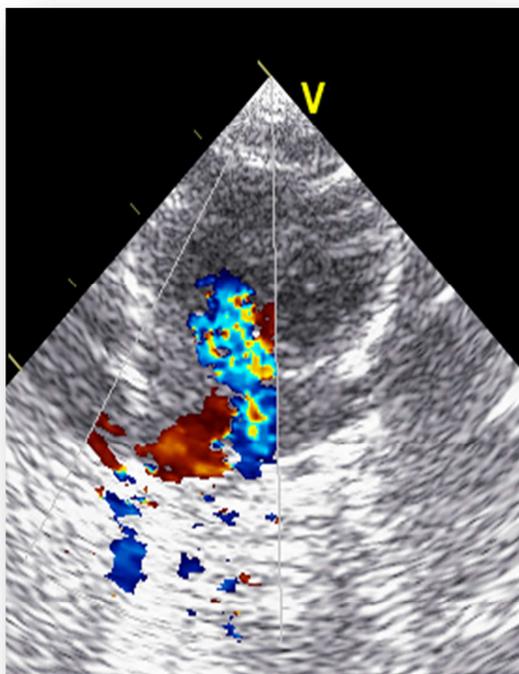


Fig. 16 – Doppler de cor de insuficiência tricúspide (a azul).

Sacrifício e necrópsia dos animais

Os animais depois de devidamente anestesiados, foram sacrificados por sobrecarga anestésica.

O peso, o comprimento focinho-ponta da cauda e o comprimento focinho – ânus foi registado para cada um dos animais.

Procedeu-se depois à remoção de vários órgãos: coração, pulmão direito e esquerdo, rim direito e esquerdo, baço e fígado. Todos eles foram pesados e, no caso do coração e do baço, efectuou-se

também a medição das suas três dimensões (comprimento/largura/espessura). As anomalias macroscópicas identificadas foram descritas e fotografadas.

Uma amostra de cada órgão foi colhida para estudo histológico. No caso do pulmão direito, recolheu-se um fragmento de cada um dos quatro lobos (cranial, medial, caudal e acessório) e no pulmão esquerdo, retiraram-se duas amostras do único lobo existente.

Preparação das amostras histológicas

Os segmentos de tecido obtidos durante a necrópsia foram fixados em formol a 4%, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Procedeu-se depois à sua desidratação em soluções de etanol com concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100%) e à sua diafanização com xilol.

O material a estudar foi então incluído em parafina e posteriormente cortado no micrótomo em cortes com espessura de cerca de 5 μm . A parafina foi depois removida pela passagem sequencial em xilol, etanol com concentrações decrescentes e água. Após a rehidratação, procedeu-se à coloração dos tecidos com hematoxilina-eosina. Por fim, efectuou-se nova desidratação seguida de montagem da lâmina.

Estudo histopatológico

Para cada rato, observaram-se ao microscópio óptico um total de nove lâminas: quatro referentes às amostras do pulmão direito, duas

correspondentes a tecido do pulmão esquerdo, uma com um corte transversal dos dois ventrículos cardíacos, uma de fígado e outra de baço.

As lâminas do pulmão foram observadas e sujeitas a uma avaliação qualitativa dos seguintes parâmetros:

Remodelação da vasculatura pulmonar
Lesão da íntima
0 – sem alteração; 1 – células endoteliais edemaciadas com protusão para o interior do lúmen
Hipertrofia da média
0 – sem alteração; 1 – ligeira; 2 – moderada; 3 – grave
Trombose
0 – sem trombose; 1- com trombose
Oclusão do lúmen
0 – sem oclusão; 1- oclusão até 1/3 do diâmetro; 2 – oclusão de 1/3 a 2/3 do diâmetro; 3 – oclusão superior a 2/3 do diâmetro
Infiltrado leucocitário
0 – ausente; 1-ligeiro; 2- moderado; 3- grave

Fig. 17 – Tabela que enumera os parâmetros de remodelação da vasculatura pulmonar avaliados nas lâminas de pulmão, indicando para cada um deles a escala utilizada.

Outros aspectos relevantes como a presença de infiltrado intersticial, edema alveolar ou hemorragia foram registados.

O estudo morfométrico da espessura da média dos vasos arteriais pulmonares foi efectuado, recorrendo a um Sistema de Análise de Imagem (*SPSS Sygma Scan Pro 5*). Estes vasos foram subdivididos

em duas categorias: vasos com diâmetro inferior a 50 µm; vasos com diâmetro entre 50 e 200 µm.

Em cada vaso analisado foi feita a medição do seu diâmetro e da espessura da respectiva camada média. O índice da média foi calculado por:

$$\frac{2 \times \text{espessura da média}}{\text{diâmetro do vaso}} \times 100$$

Uma vez que o uso da monocrotalina, induz um alargamento significativo da adventícia, optou-se por usar o índice da média corrigido, no qual o diâmetro do vaso é considerado como englobando apenas o lúmen e a camada média. Para cada uma das categorias consideradas, o índice da média é apresentado como a média de três medições de diferentes vasos.

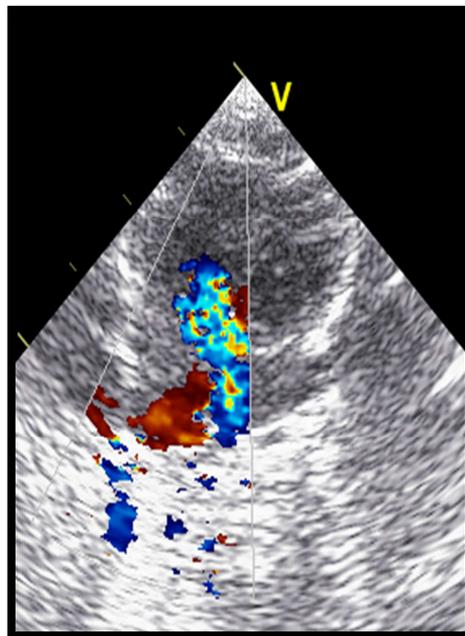
As lâminas com tecido cardíaco foram observadas e foi atribuído um grau de hipertrofia numa escala qualitativa de 0 (ausente) a 3 (grave).

Análise estatística

Os valores ecocardiográficos e morfométricos apresentados para cada animal correspondem à média de três medições. Os resultados obtidos para os quatro grupos foram calculados utilizando a média dos valores individuais de cada rato.

Para cada parâmetro, utilizou-se o teste ANOVA e o teste de Dunnett para identificar diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios dos ratos do grupo controle e os valores obtidos nos grupos teste. Para aceitar a distribuição Gaussiana dos valores e a igualdade de variância nos diferentes grupos (pré-requisitos do teste ANOVA e teste de Dunnett) aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e o teste de homogeneidade de variâncias, respectivamente. Calculou-se ainda o coeficiente de correlação para aferir o grau de dependência dos diferentes parâmetros ecocardiográficos com o tempo. Procedeu-se do mesmo modo para verificar qual dos dados ecocardiográficos melhor se relacionava com a hipertrofia arterial pulmonar. Para os cálculos, recorreu-se ao programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 18, utilizando-se como nível de significância $p = 0,05$.

8. RESULTADOS



8. RESULTADOS

Evolução sintomática e mortalidade

Alguns sinais de hipertensão pulmonar eram já evidentes duas semanas após a injeção de monocrotalina. Os animais estavam polipneicos, com maior irritabilidade e com espirros frequentes. Os pêlos estavam menos brilhantes e amarelados. À medida que se progrediu para a 4ª e 6ª semana de estudo, verificou-se o aparecimento de anorexia, astenia com diminuição da deambulação na gaiola e cianose periférica de instalação progressiva.

Nos grupos T1 e T2 todos os animais sobreviveram.

No grupo T3, dos 13 animais iniciais apenas 6 sobreviveram (mortalidade de 54%). Quatro animais morreram sem que houvesse possibilidade de efectuar ecocardiografia ou necrópsia; três morreram durante a indução anestésica, pelo que não se realizou ecocardiografia, mas foram estudados do ponto de vista anatomopatológico.

Dados ecocardiográficos

Em cada grupo foram estudados ecocardiograficamente 6 animais. Numa apreciação global, pôde-se constatar um gradual aumento do volume das cavidades direitas, que chegaram a ter, no grupo T3, dimensões muito superiores às correspondentes do lado esquerdo.

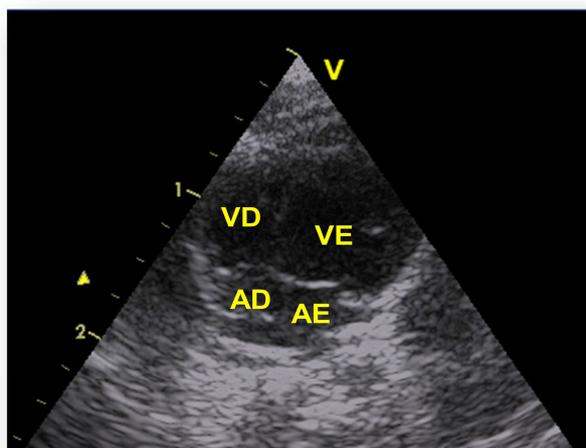


Fig.18 – Imagem ecocardiográfica em incidência apical de um animal do grupo controle. É de notar o predomínio de cavidades esquerdas. VD - ventrículo direito. AD - aurícula direita. VE – ventrículo esquerdo. AE – aurícula esquerda.

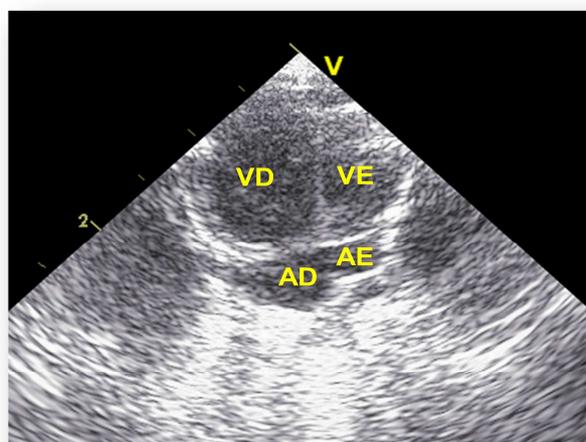


Fig.19 – Imagem ecocardiográfica em incidência apical de um animal do grupo T3, evidenciando o predomínio de cavidades direitas, devido à dilatação do ventrículo direito (VD) e aurícula direita (AD). VE – ventrículo esquerdo. AE – aurícula esquerda.

O contorno do ventrículo esquerdo tornou-se cada vez mais excêntrico, dada a rectificação ou mesmo abaulamento do septo interventricular para o interior da cavidade ventricular esquerda (figura 20).

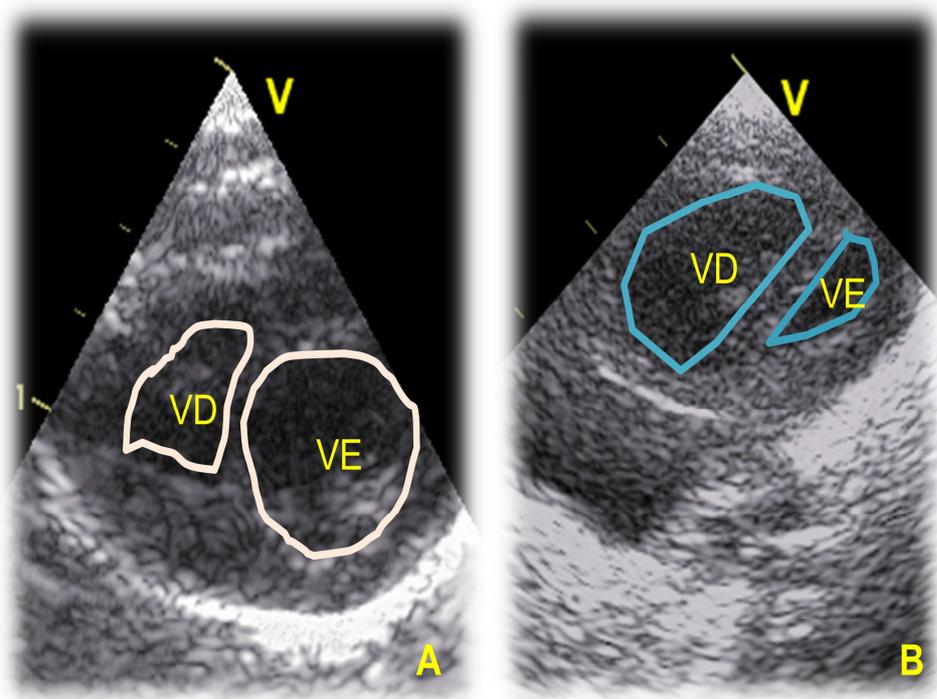


Fig. 20 – Contornos do ventrículo direito (VD) e do ventrículo esquerdo (VE) em incidência de eixo curto de ventrículos. A - Animal do grupo de controlo. B - Animal do grupo T3.

A insuficiência tricúspide não foi detectada no GC, T1 e T2. Estava porém presente em 3 dos animais sobreviventes do grupo T3 (figura 21). A média das PSAPs estimadas a partir da velocidade do jacto regurgitante, foi de 66 mmHg.

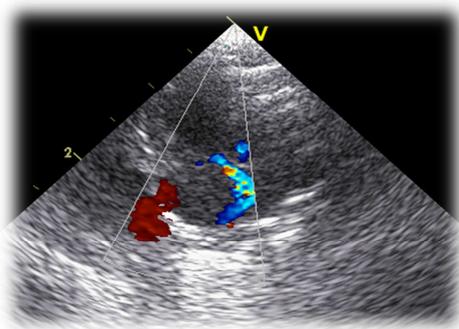


Fig. 21 – Doppler de cor aplicado na incidência apical para detectar o jacto da insuficiência tricúspide (a azul) que se prolonga até ao teto da aurícula direita.

Observando as imagens por Doppler pulsado do fluxo pulmonar pôde-se apreciar a diminuição progressiva do tempo de aceleração, com aparecimento da incisura sistólica em três dos seis animais do grupo T3.

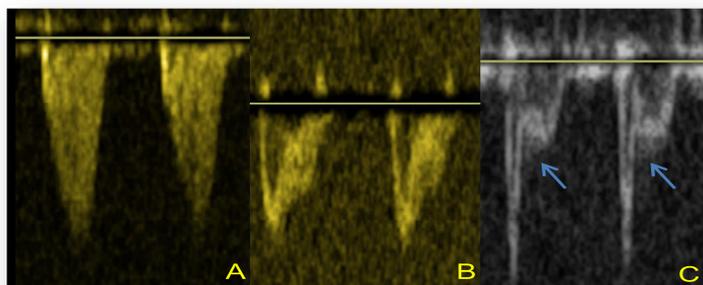


Fig.22 - Imagens de Doppler pulsado do fluxo pulmonar de animal do grupo de controlo (A), do grupo T2 (B) e do grupo T3 (C). Verifica-se uma diminuição progressiva (de A para C) do tempo de aceleração, bem como o aparecimento da incisura diastólica (assinalada com as setas azuis).

Os resultados da avaliação quantitativa dos diferentes parâmetros ecocardiográficos estão esquematizados na representação gráfica das figuras 23.

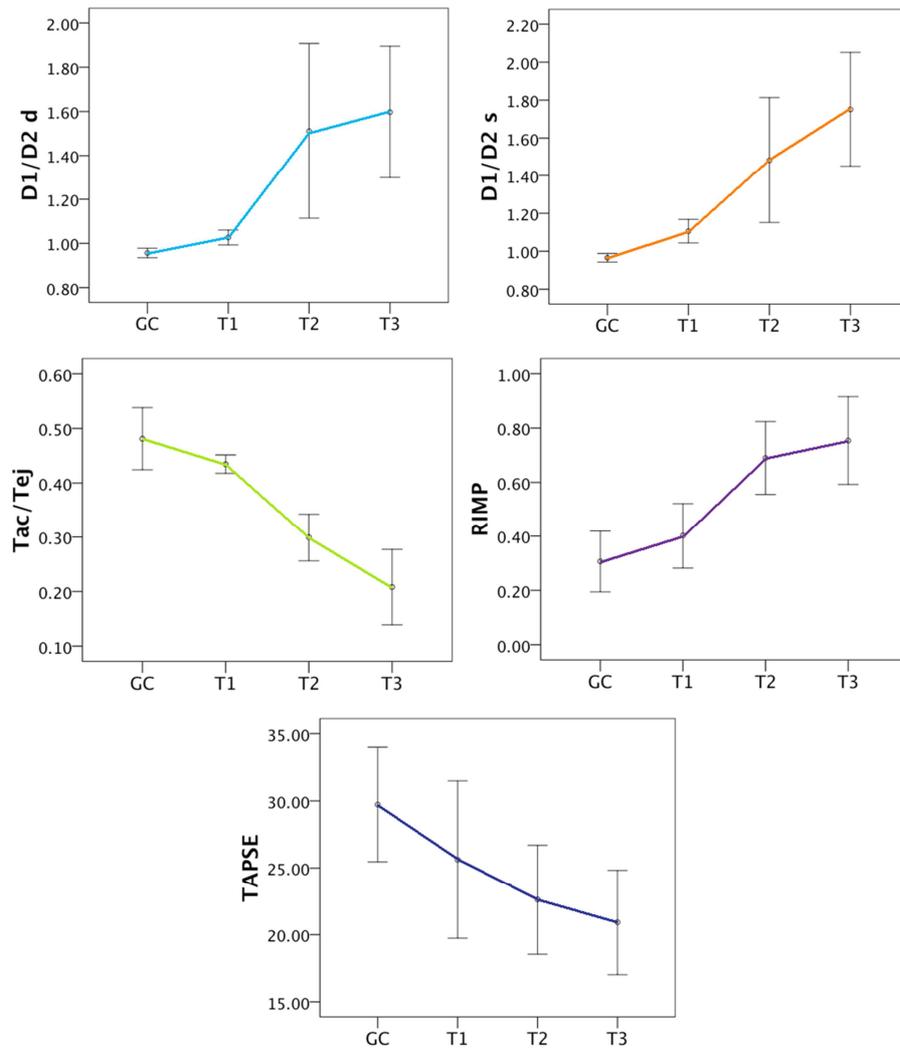


Fig.23 – Representação gráfica da variação dos diferentes parâmetros ecocardiográficos à medida que se instala a hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina, mostrando para cada grupo o respectivo intervalo de confiança (95%). Tac- tempo de aceleração; Tej – tempo de ejeção; D1/D2d – índice de excentricidade em diástole; D1/D2s – índice de excentricidade em sístole.

Verificou-se ao longo das 6 semanas uma redução progressiva da TAPSE e do tempo de aceleração do fluxo pulmonar (Tac). Por sua vez, o RIMP e o índice de excentricidade, quer em sístole, quer em diástole sofreram um aumento. As variações sofridas estão em estreita correlação com o tempo decorrido após a injeção de monocrotalina (ver figura 24 em que os valores de correlação são sempre superiores a 0.95). No entanto, a inclinação da curva dos gráficos é mais acentuada entre o grupo T1 e T2. Em consonância com estes resultados, a tabela da figura 25 mostra que é só a partir do grupo T2 (inclusivé) que se obtém diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo. Este comportamento verificou-se para todos os parâmetros ecocardiográficos analisados.

	Coeficiente de correlação com o tempo após injeção de MCT
TAPSE	- 0.98
Tac/Tej	- 0.98
RIMP	0.97
D1/D2 s	0.95
D1/D2 d	0.98

Fig.24 – Tabela que indica o grau de correlação entre os diferentes parâmetros ecocardiográficos e o tempo decorrido após a administração da monocrotalina (MCT). Tac- tempo de aceleração; Tej – tempo de ejeção; RIMP – índice de performance miocárdica do ventrículo direito; D1/D2 d – índice de excentricidade em diástole; D1/D2 s – índice de excentricidade em sístole.

	GC vs GT1	GC vs GT2	GC vs GT3
TAPSE	0.136	0.007	0.001
Tac/Tej	0.188	0.000	0.000
RIMP	0.254	0.000	0.000
D1/D2 s	0.582	0.002	0.000
D1/D2 d	0.351	0.001	0.000

Fig.25 – Tabela que indica para cada parâmetro analisado (coluna a cinzento), os p -valores obtidos por comparação do grupo controlo com cada um dos grupos teste (coluna a rosa). A negrito foram destacados os valores que são estatisticamente significativos quando utilizado um nível de significância de $p = 0.05$.

Necrópsia

Foram efectuadas um total de 27 necrópsias: 6 do grupo controlo, 6 do grupo T1, 6 do grupo T2 e 9 do grupo T3. O perfil dos animais em termo de peso e comprimento para os diferentes grupos é apresentado nos gráficos de barras da figura 26. No que diz respeito ao peso dos órgãos colhidos, eles são apresentados como percentagem do peso corporal total (figura 27).

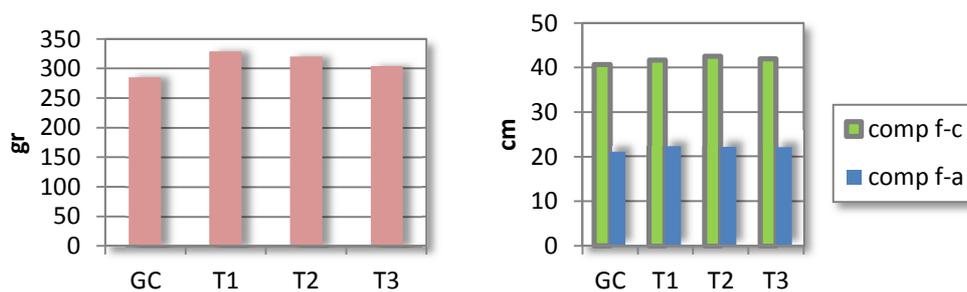


Fig. 26 – O gráfico à esquerda representa o peso médio dos animais de cada grupo na altura da necrópsia. O gráfico à direita mostra o comprimento focinho-cauda (a verde) e o comprimento focinho-ânus (a azul).

Verificou-se uma tendência para o aumento do peso relativo do coração, pulmões e baço, mas isto não se verificou a nível hepático ou renal. Apenas no pulmão e rim se identificaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controlo (GC) e o grupo de teste T3.

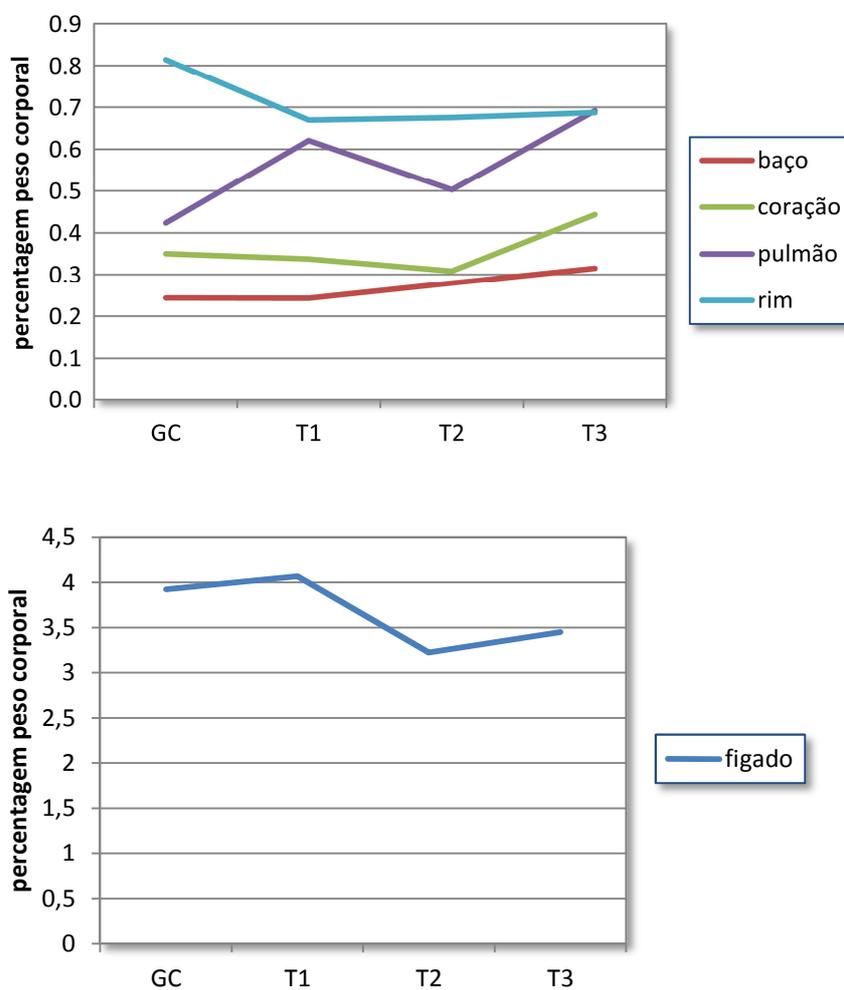


Fig. 27 – Evolução do peso relativo dos vários órgãos.

Como última nota, referir que no grupo T3, três animais desenvolveram derrame pleural bilateral. Em um caso, o derrame tinha características hemorrágicas e ocupava um volume de cerca de 5 ml. Nos outros dois casos, o derrame tinha entre 15 a 20 ml de volume e apresentava um aspecto citrino. A análise citoquímica confirmou tratar-se de transudato.

Dados anatomopatológicos

Um total de 243 lâminas foram observadas e caracterizadas em termos anatomopatológicos. Elas correspondiam a seis amostras de pulmão, a uma amostra de coração, fígado e baço, por cada rato necropsiado.

De uma forma genérica, pode-se dizer que 15 dias após a injeção de monocrotalina, era já evidente várias alterações, quer no parênquima pulmonar, quer a nível dos vasos arteriais. De facto, em todos os pulmões dos animais do grupo T1, encontrou-se edema intersticial, acompanhado de exsudato alveolar (em 2 casos) e de edema perivascular (em 2 casos) – ver figuras 28 a 30. Os vasos arteriais de menor calibre (inferior a 50 µm) passaram a evidenciar uma hipertrofia significativa da camada média. Estes pequenos vasos encontravam-se severamente obstruídos, não apenas pela hipertrofia referida, mas também pela protusão dos núcleos e de projecções citoplasmáticas das células da íntima para o interior do lúmen (figura 31). A obstrução dos vasos de maior calibre era substancialmente menor, exceptuando em duas artérias em que se detectaram fenómenos de trombose intraluminais (figura 32). Um ligeiro infiltrado

inflamatório era já identificável, mas ainda pouco acentuado. Em dois casos, a estrutura pulmonar estava danificada por processo infeccioso grave com fenômenos de atelectasia e consolidação (figura 33).

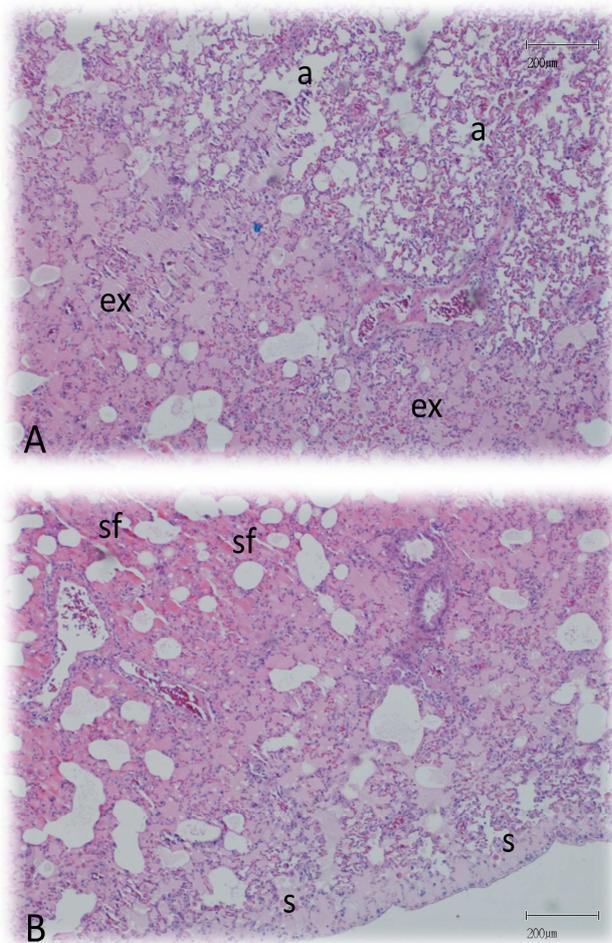


Fig. 28 – Imagens de parênquima pulmonar de ratos do grupo T1. A – Nesta figura é possível identificar uma zona com alvéolos relativamente arejados (a), contrastando com a região do canto inferior esquerdo, onde se observa exsudato pulmonar (ex). B – Zonas de exsudato alveolar mais seroso (s) ou serofibrinoso (sf),

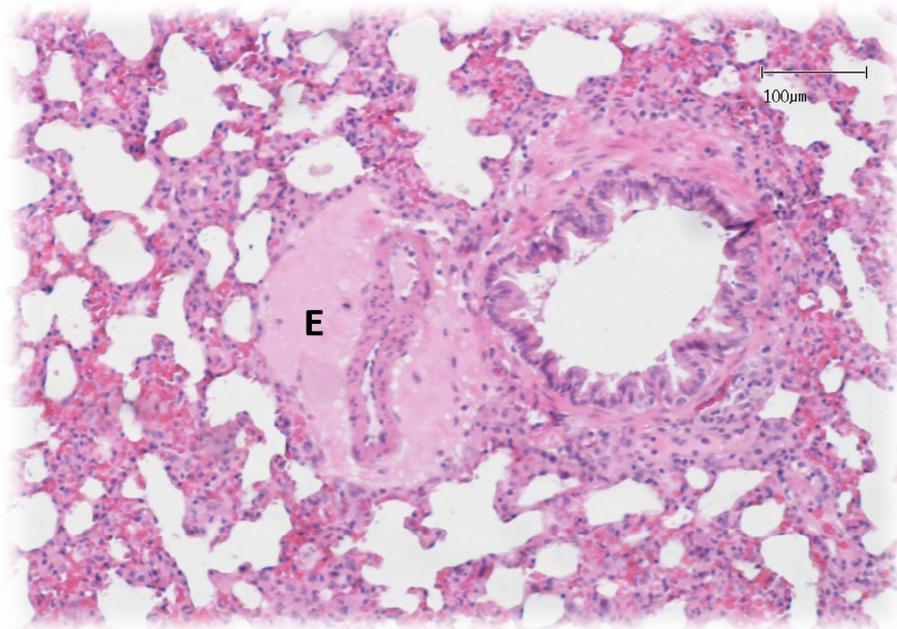


Fig. 29 – Edema perivascular (E) em corte histológico de pulmão de um rato do grupo T1.

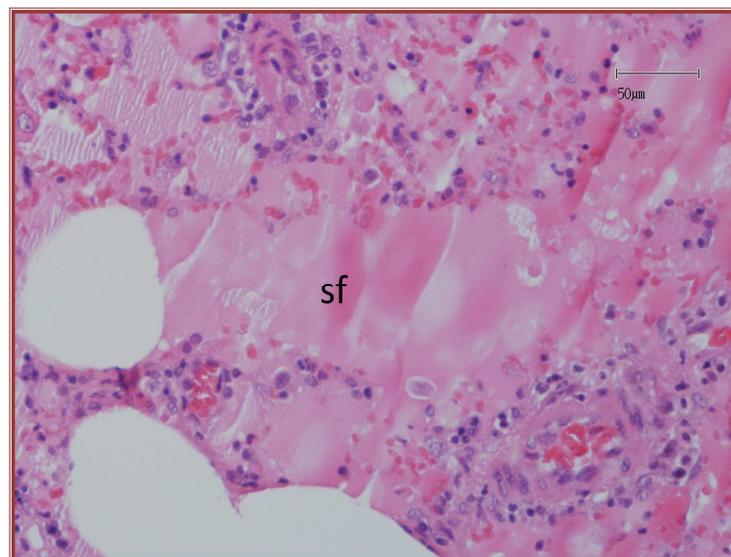


Fig. 30 – Grande ampliação de zona alveolar com exsudato serofibrinoso.

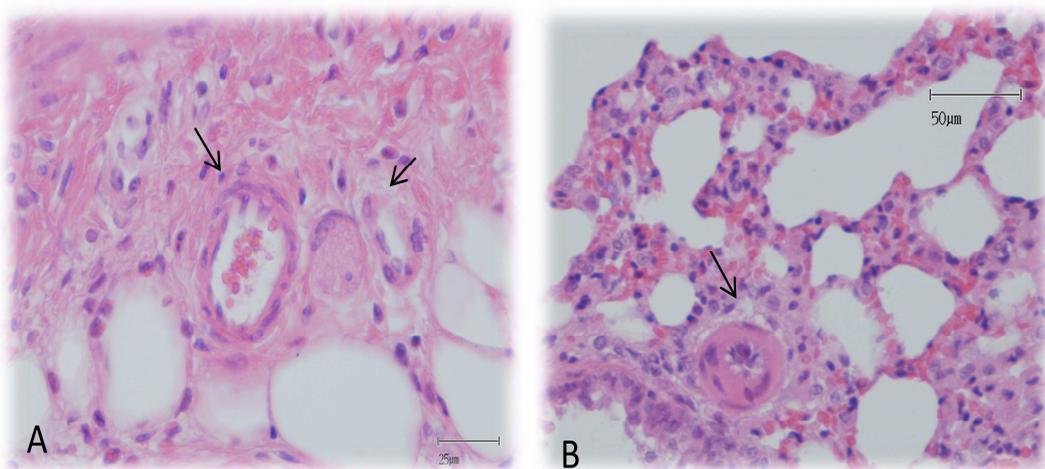


Fig. 31 – Vasos arteriais de dimensão inferior a 50 µm observados em animal do grupo controlo (A) e em animal do grupo T1 (B). Em B, é evidente a hipertrofia da média e a protusão dos núcleos para o interior do lúmen.

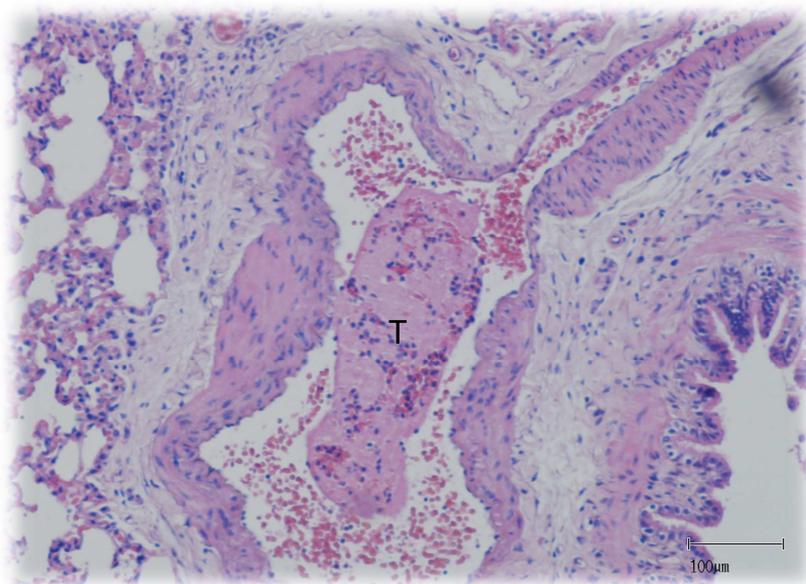


Fig. 32 – Trombo (T) identificado em artéria pulmonar de rato do grupo T1.

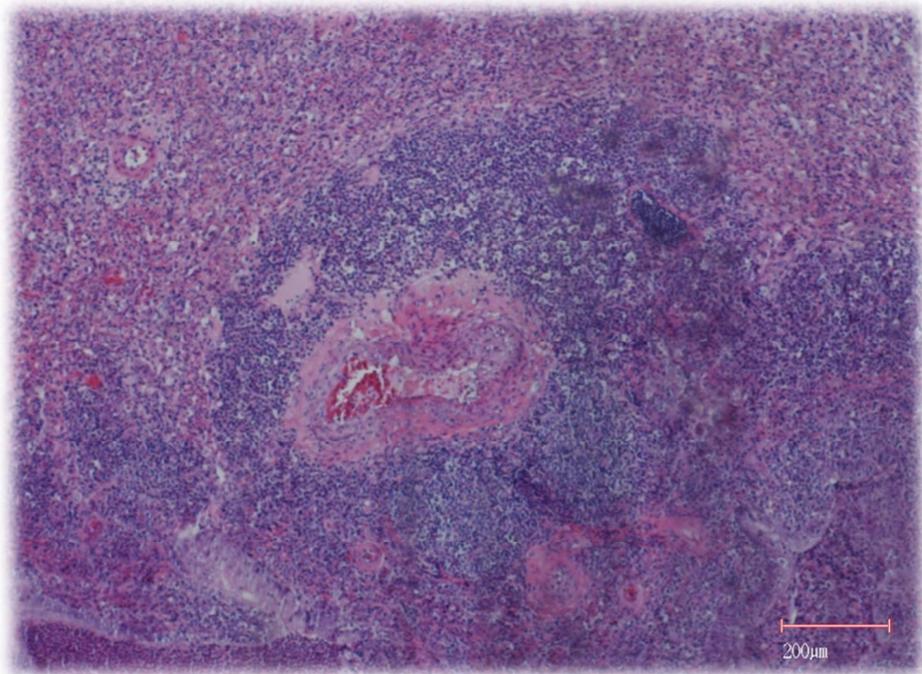


Fig. 33 – Aspecto do parênquima pulmonar de um dos dois ratos com pneumonia.

A progressão para o grupo T2 e T3 caracterizou-se por um aumento da hipertrofia da camada média, que se tornou progressivamente mais notório nos vasos arteriais de maior calibre (figura 34). O infiltrado inflamatório perivascular acentuou-se (figura 35), passando a penetrar (nos ratos do grupo T3) a espessura da parede dos vasos, destruindo a sua arquitectura (figura 37).

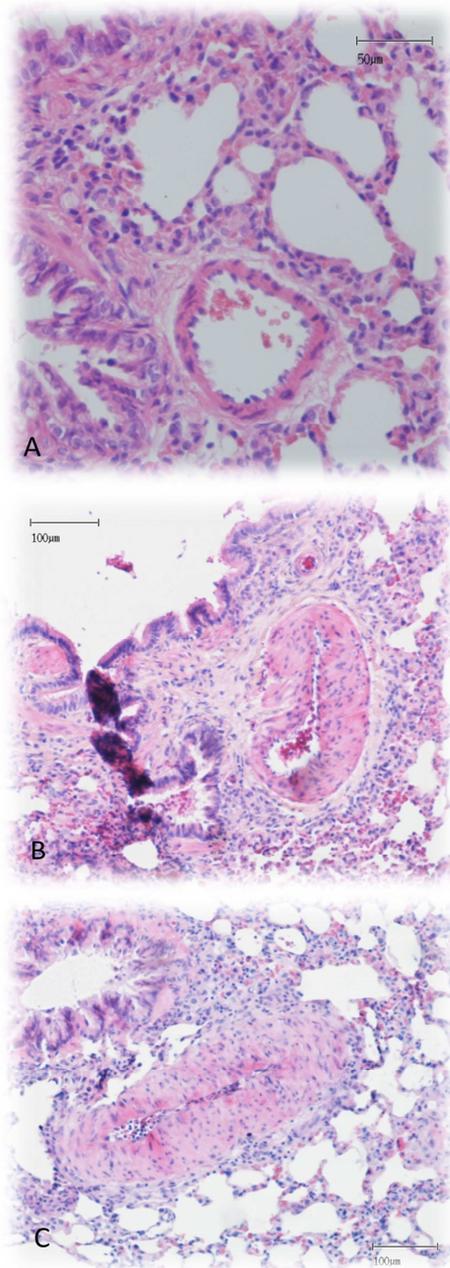


Fig. 34 – Artérias do pulmão de animal do grupo controlo (A), de animal do grupo T2 (B) e do grupo T3 (C). Em B e C é evidente a hipertrofia da camada média.

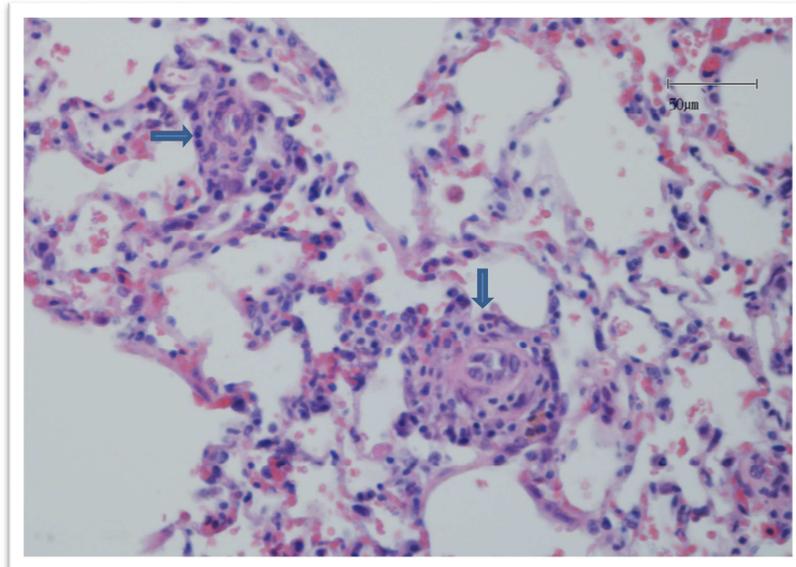


Fig. 35 – Infiltrado inflamatório perivascular (setas azuis) em animal do grupo T3.

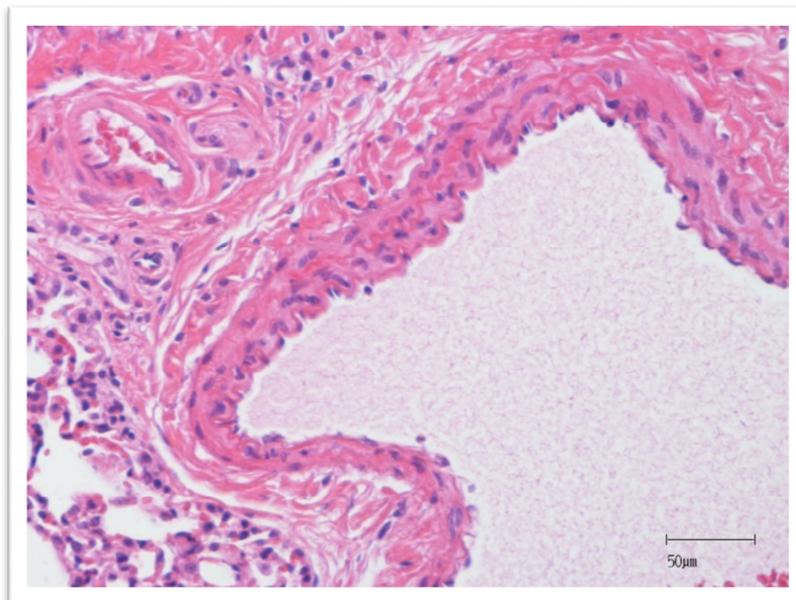


Fig. 36 – Aspecto da parede de uma artéria pulmonar do grupo controle.

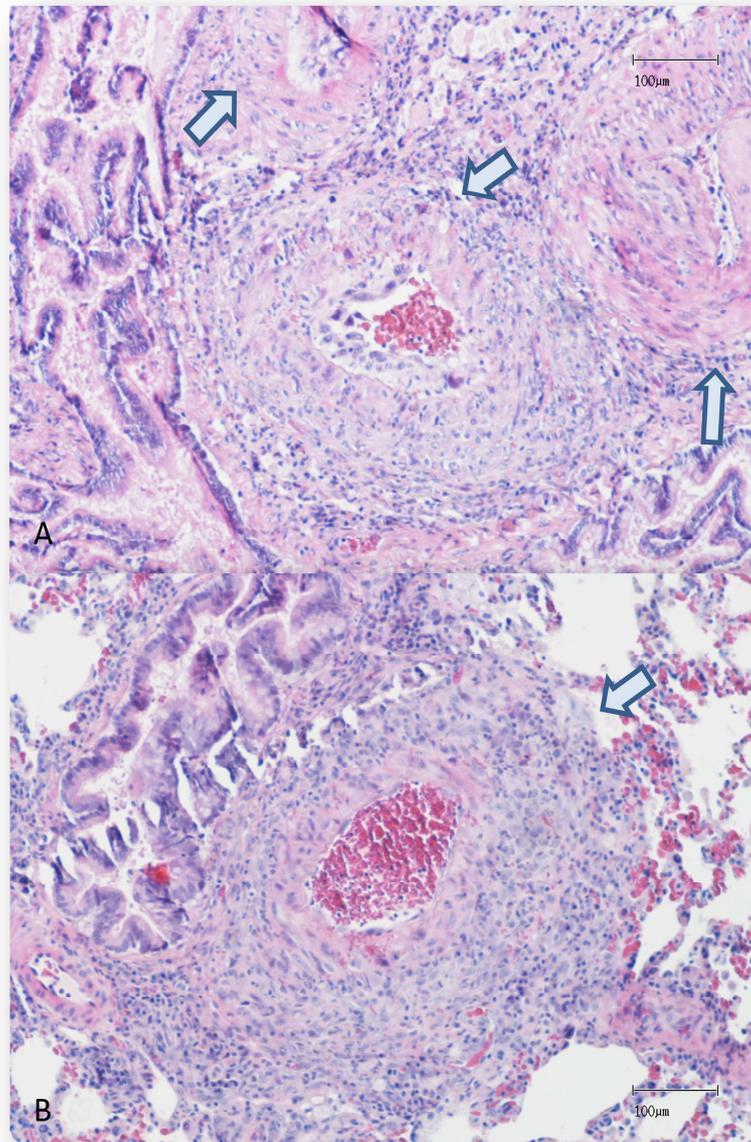


Fig. 37 A e B – Aspecto típico das artérias pulmonares do grupo T3 (setas azuis). É evidente o abundante infiltrado inflamatório, quer a nível da adventícia, quer a nível da média.

No que diz respeito às alterações parenquimatosas, elas mantiveram-se presentes nos animais dos grupos T2 e T3. O edema intersticial foi sempre uma constante. Todos os animais do grupo T3 apresentavam também edema alveolar com aumento significativo dos macrófagos alveolares que tinham um aspecto esponjoso (figura 38).

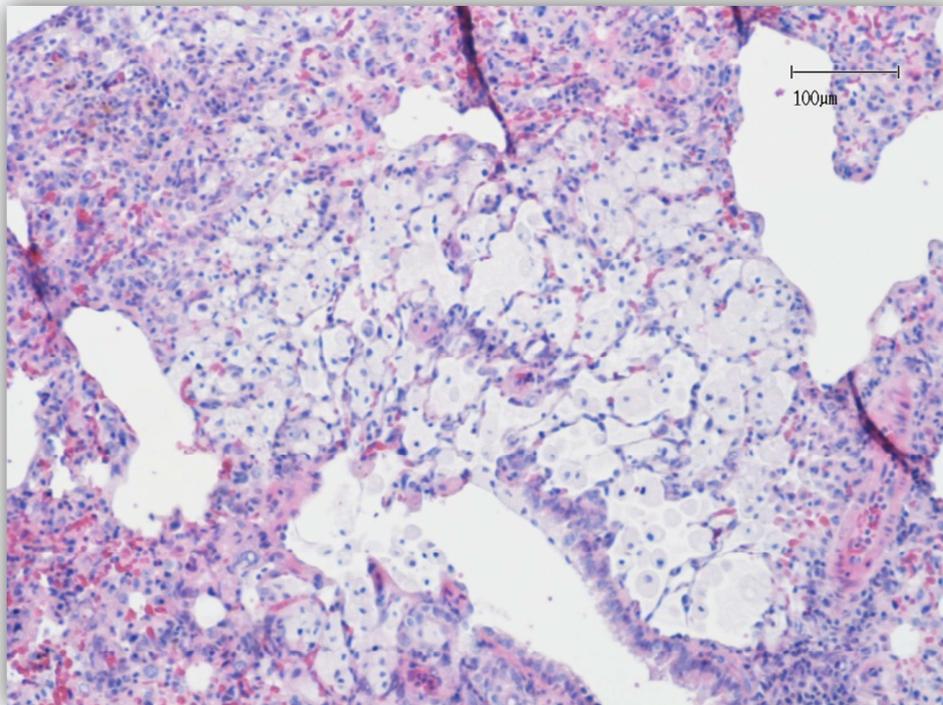


Fig.38 – Edema alveolar em rato do grupo T3, onde se pode identificar inúmeros macrófagos alveolares com aspecto esponjoso.

O músculo cardíaco também sofreu alterações, com hipertrofia progressiva localizada sobretudo ao ventrículo direito e septo interventricular (figura 39).

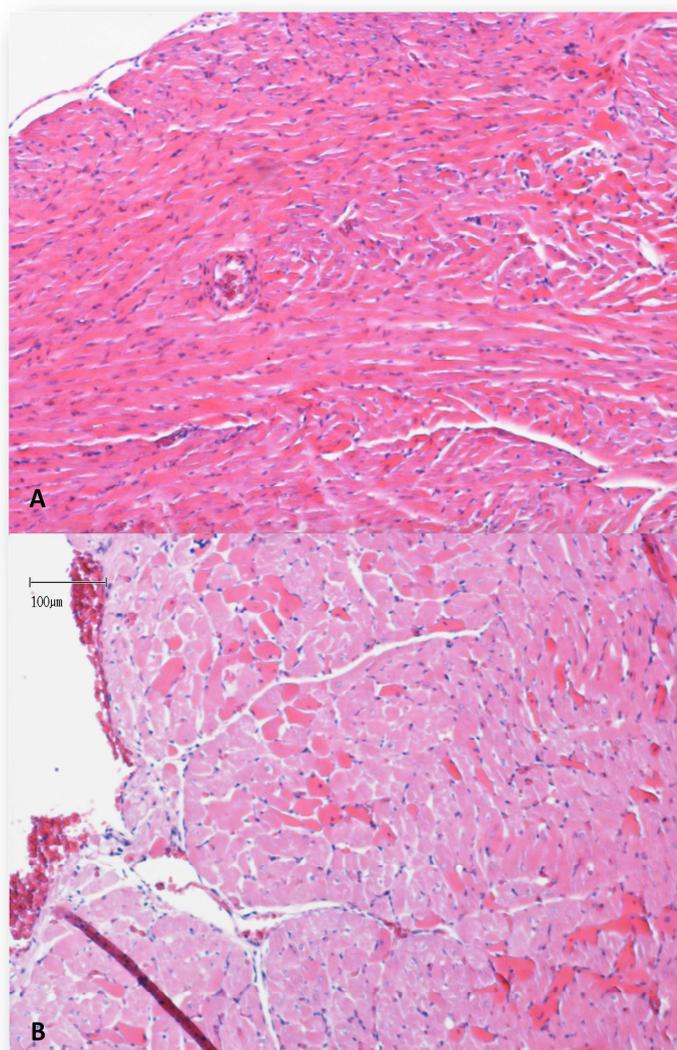


Fig. 39 – Miocárdio de animal do grupo controle (A) e de animal do grupo T3 (B). A hipertrofia evidencia-se pelo aumento da dimensão do diâmetro dos miócitos e pelo aumento do conteúdo de colagénio.

Os resultados da avaliação qualitativa da vasculatura pulmonar/miocárdio, bem como os dados obtidos a partir do estudo morfométrico reflectem o exposto e encontram-se esquematizados nos gráficos das figuras 40 e 41.

Para esta análise foram excluídos os dois ratos do grupo T1 que tinham pneumonia, uma vez que as alterações histopatológicas induzidas pelo processo infeccioso iriam distorcer significativamente os resultados.

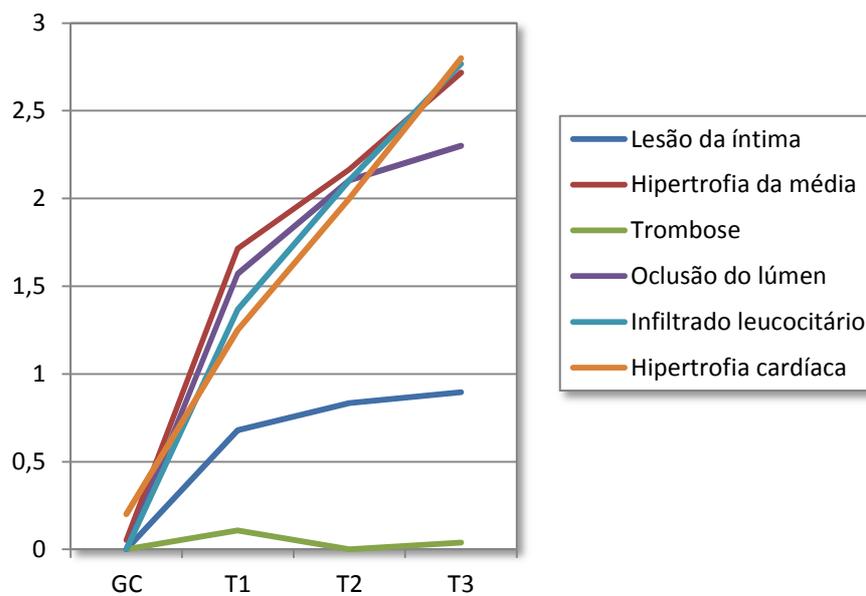


Fig. 40 – Gráfico que esquematiza a evolução dos vários parâmetros utilizados na análise qualitativa da vasculatura pulmonar (ver figura 17) e do miocárdio. É importante salientar que a trombose e a lesão da íntima têm como valor máximo “1” e não “3” como acontece nos restantes critérios.

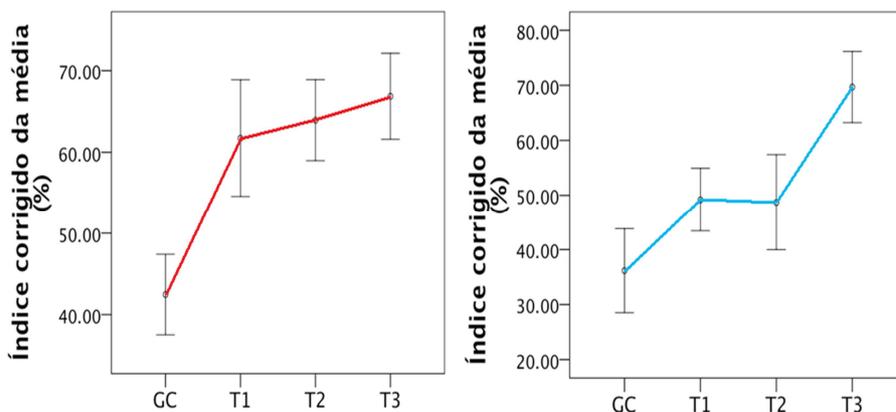


Fig. 41 – Representação gráfica dos resultados do estudo morfométrico efectuado quer para as artérias de calibre inferior a 50 µm (à esquerda), quer para as artérias com calibre entre 50 e 200 µm (à direita). Para além da evolução das médias de cada grupo, está também esquematizado o respectivo intervalo de confiança (95%).

	GC vs GT1	GC vs GT2	GC vs GT3
p	0.000	0.000	0.000
G	0.097	0.185	0.000

Fig.42 – Tabela que indica para cada parâmetro analisado (coluna a cinzento), os p-valores obtidos por comparação do grupo controlo com cada um dos grupos teste (coluna a rosa). índice corrigido da média das artérias de calibre inferior a 50 µm (p); índice corrigido da média das artérias com calibre entre 50 e 200 µm (G).

Os dados das figuras 41 e 42 permitem concluir que a hipertrofia da média dos vasos com diâmetro inferior a 50 µm se instala precocemente. O mesmo não acontece nos vasos de maior calibre, onde diferenças estatisticamente significativas face ao grupo controlo

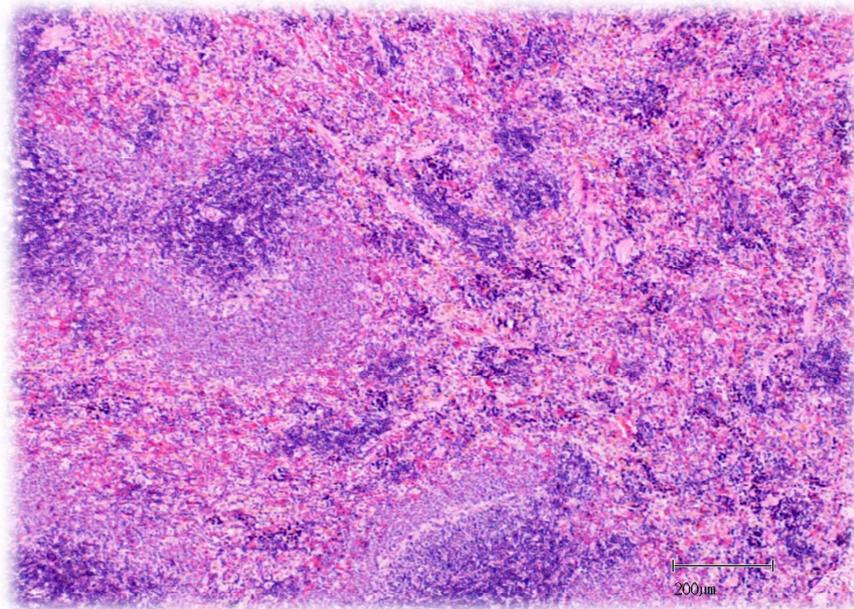
(para o nível de significância $p = 0.05$) foram encontradas apenas no grupo T3, o qual representa uma fase já muito avançada da doença.

Comparou-se por isso a hipertrofia dos vasos arteriais de menor calibre com os diferentes parâmetros ecocardiográficos. A análise dos resultados obtidos (figura 43) permite constatar que a TAPSE foi o valor que melhor se correlacionou com esta alteração anatomo-patológica.

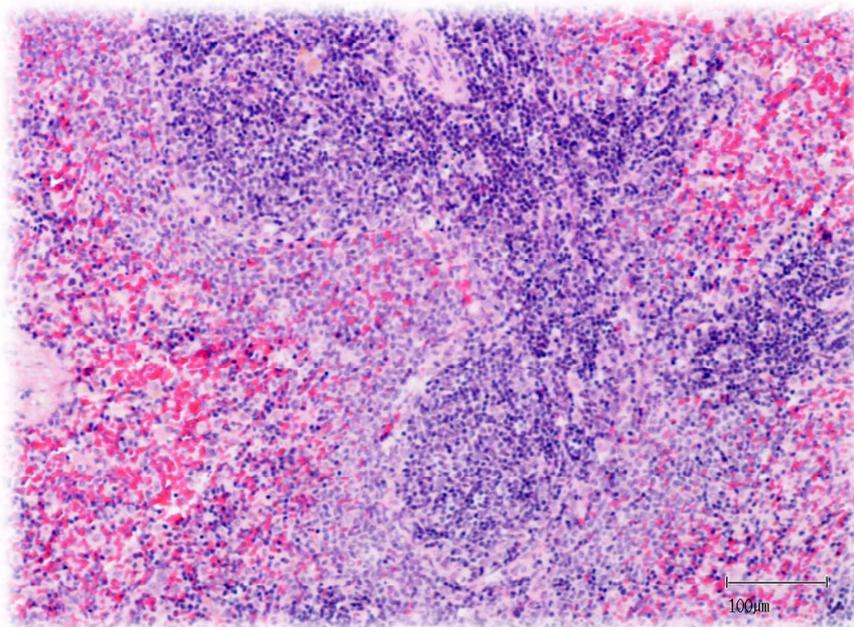
	Coefficiente de correlação com o grau de hipertrofia das artérias de menor calibre
TAPSE	-0,94
Tac/Tej	-0,79
RIMP	0,82
D1/D2 s	0,76
D1/D2 d	0,78

Fig.43 – Tabela que indica o grau de correlação entre os diferentes parâmetros ecocardiográficos e o grau de hipertrofia das artérias de calibre inferior a 50 μm . Tac- tempo de aceleração; Tej – tempo de ejeção; RIMP – índice de performance miocárdica do ventrículo direito; D1/D2 d – índice de excentricidade em diástole; D1/D2 s – índice de excentricidade em sístole;

No que diz respeito ao baço, ele tinha uma histologia normal no grupo controlo, mas apresentou-se como órgão de estase em todos os animais dos grupos teste. O aspecto congestivo acentuava-se progressivamente nos grupos T2 e T3 (figura 44).



A



B

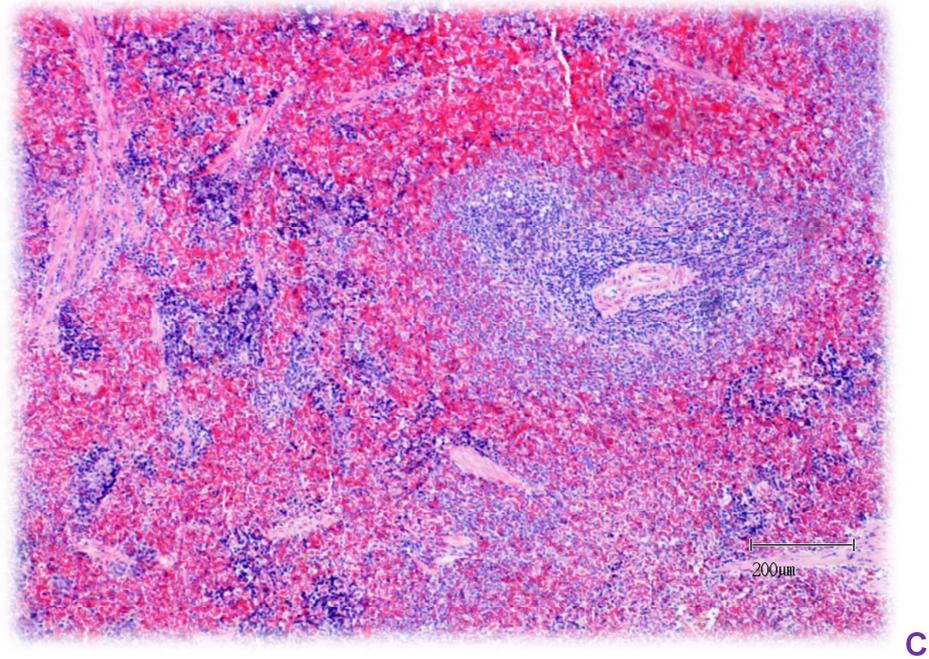


Fig. 44 – Cortes histológicos de baço do grupo T1 (A), do grupo T2 (B) e do grupo T3 (C). É evidente o progressivo aumento da congestão esplênica.

À semelhança do baço, o fígado também tinha uma histologia normal no grupo controlo e aspecto congestivo no grupo T1. No entanto, no grupo T2, a estase tornou-se um achado mais inconstante e identificaram-se pequenos focos de necrose hepatocitária. No grupo T3, estes focos eram mais evidentes, havendo zonas de vacuolização e alguma estase (figura 45).

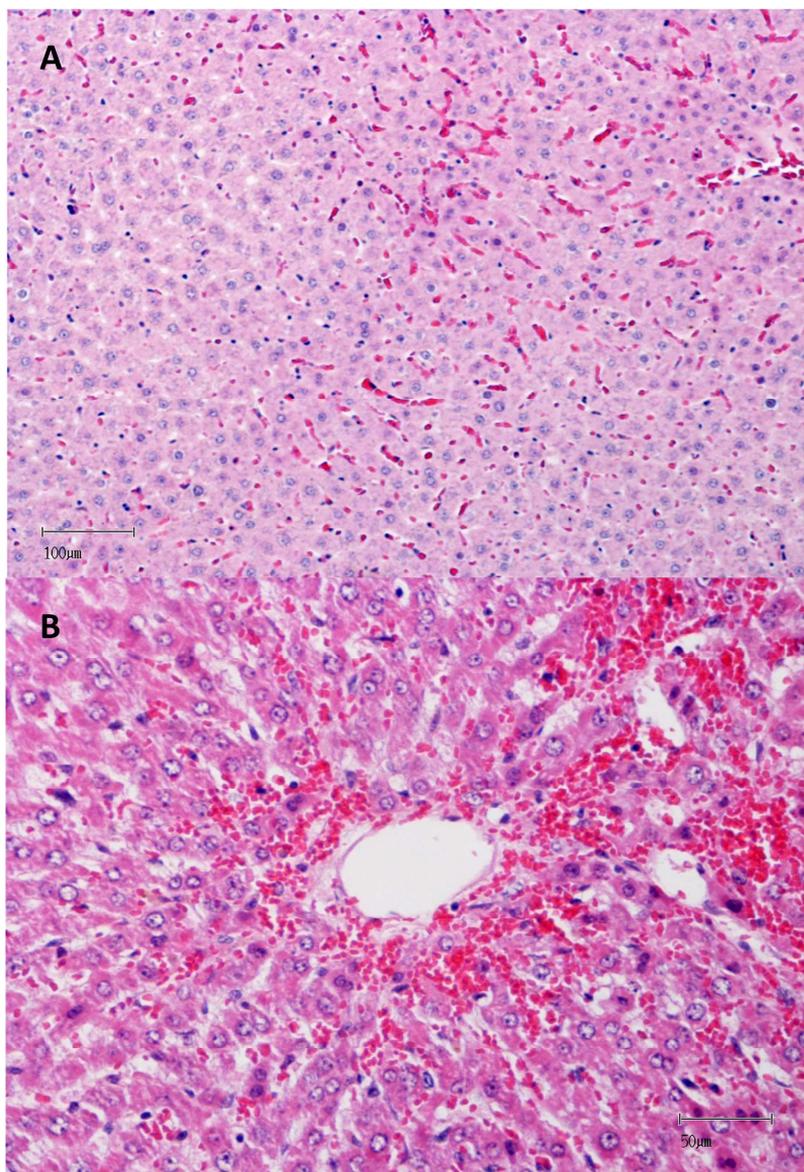


Fig. 45 – Cortes histológicas de fígado do grupo T1 (A) e do grupo T3 (B), evidenciando aspecto congestivo do órgão. Na imagem 45B observa-se também focos de necrose e vacuolização.

9. DISCUSSÃO



9. DISCUSSÃO

O modelo de hipertensão pulmonar por monocrotalina, tem sido largamente utilizado na investigação desta doença.

A análise dos resultados é frequentemente efectuada recorrendo a técnicas de hemodinâmica ou à avaliação anatomopatológica das alterações estruturais desenvolvidas. No entanto, cada um destes métodos tem desvantagens específicas.

O cateterismo requer não só a utilização de equipamento dispendioso, de finalidade confinada a uso experimental, como também necessita de perícia técnica específica por parte do investigador. Para além disso, tratando-se de um processo invasivo, está associado a alguma mortalidade e só pode ser efectuada até duas vezes no mesmo rato. Por sua vez, o estudo anatomopatológico implica frequentemente o sacrifício do animal e não é informativo relativamente aos parâmetros hemodinâmicos.

Neste contexto, a ecocardiografia transtorácica tem vindo a assumir um interesse crescente na comunidade científica, como ferramenta de estudo, não só no modelo de monocrotalina, mas em todos os trabalhos experimentais em que alguma repercussão cardíaca é esperada.

Prova deste fenómeno são as publicações dos últimos anos que salientam a eficácia e benefícios desta modalidade imagiológica na experimentação em pequenos animais de laboratório^{41,42}. De facto, a ecocardiografia é um método inócuo que permite acompanhar a acção de determinado factor na evolução da doença em estudo. Para além disso, os avanços tecnológicos têm vindo a permitir uma avaliação

ecográfica cada vez mais precisa da estrutura e função do coração do animal⁴³.

No que diz respeito especificamente, ao modelo de monocrotalina, um estudo de 2002⁴⁴ demonstrou a existência de uma correlação linear entre certos parâmetros ecocardiográficos (tempo de aceleração do fluxo pulmonar e gradiente de pressões ventrículo direito/aurícula direita) e os valores da pressão arterial pulmonar medidos por cateterismo.

À semelhança dos resultados por nós obtidos, também neste estudo a insuficiência tricúspide foi um achado tardio (6 semanas após a injeção de monocrotalina), aparecendo para valores de PSAP superiores a 65 mmHg. Para valores de pressão arterial pulmonar inferiores, a correlação era estabelecida com o tempo de aceleração.

O trabalho não abordava contudo a análise de alguns dos parâmetros ecocardiográficos que, no homem, são considerados como factores de prognóstico⁴⁵⁻⁴⁷. Referimo-nos especificamente ao TAPSE, ao índice de excentricidade e ao RIMP.

Alguns anos mais tarde, Hardziyenka *et al*⁴⁸ estabeleceram uma sequência temporal no aparecimento das alterações ecocardiográficas no modelo de monocrotalina: a diminuição do tempo de aceleração (indicadora da hipertensão pulmonar) e o aumento da espessura da parede livre do ventrículo direito (indicador de hipertrofia ventricular direita) precediam o aumento do diâmetro telediastólico do ventrículo direito (indicador de dilatação do ventrículo) e diminuição da TAPSE (indicadora de disfunção sistólica).

No nosso estudo e no que diz respeito ao tempo de aceleração e TAPSE, esta sequência não se verificou. Este facto deve-se

provavelmente a ter sido usado um intervalo temporal superior entre as diferentes medições.

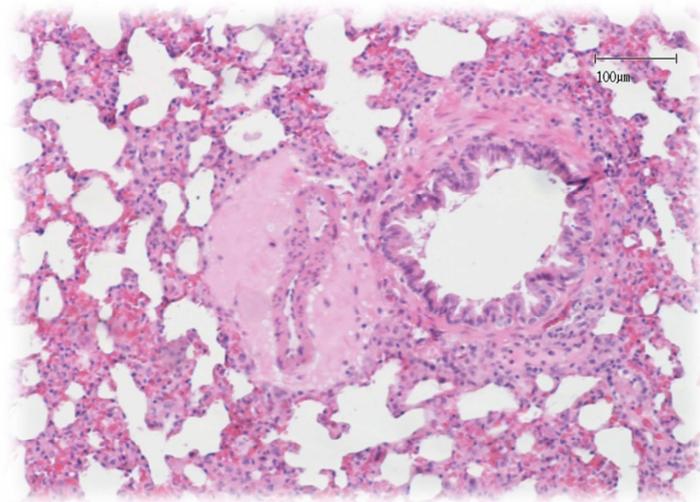
Mais recentemente (Setembro de 2009)⁴⁹, o RIMP foi utilizado como um dos parâmetros ecocardiográficos avaliados num estudo que explorava os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca na hipertensão pulmonar. A progressão do RIMP neste estudo e os valores de referência obtidos são muito semelhantes àqueles por nós encontrados.

Segundo os nossos resultados, no modelo de hipertensão pulmonar com monocrotalina, o tempo de aceleração do fluxo pulmonar, o RIMP, o TAPSE e o índice de excentricidade correlacionam-se com a progressão da doença, à semelhança do que acontece no ser humano. De facto, a evolução destes parâmetros acompanhou não só as alterações histopatológicas que se desenvolveram a nível pulmonar e cardíaco, mas também a clínica apresentada pelos ratos. No que diz respeito aos achados macroscópicos da necrópsia também eles corroboraram o exposto. De facto, o aumento do peso dos pulmões (sugestivo de congestão pulmonar), o aumento do peso do coração (sugestivo de hipertrofia ventricular) e o desenvolvimento de derrame pleural (em T3) são argumentos acrescidos da correlação ecocardiografia/evolução da doença.

Esperávamos contudo, como resultado da insuficiência cardíaca direita e da congestão hepática, encontrar aumento progressivo do peso do fígado. Isto não ocorreu, apesar de um aumento inicial da massa deste órgão. Este facto provavelmente explica-se pelo efeito hepatotóxico da monocrotalina que conduziu a uma progressiva lesão hepática e desenvolvimento de hipertensão portal, de acordo com o

descrito por Perazzo *et al.* ⁴³ Isto justificaria a ausência de hepatomegália, e explicaria também a esplenomegália que se desenvolveu a partir da 2ª semana após a injeção da monocrotalina. O aspecto histológico do baço e fígado dos diferentes grupos reforça esta suposição.

10. CONCLUSÕES



10. CONCLUSÕES

A ecocardiografia é um método imagiológico que permite de forma não invasiva avaliar a progressão da hipertensão pulmonar no modelo de monocrotalina.

Para este efeito, pode-se recorrer a um conjunto de parâmetros tradutores da severidade da doença, como seja o quociente tempo de aceleração/tempo de ejeção pulmonar, o índice de excentricidade do ventrículo esquerdo, o índice de desempenho miocárdico do ventrículo direito, a excursão sistólica do plano da tricúspide e o gradiente ventrículo direito/aurícula direita, se se identificar a insuficiência tricúspide.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS



Foto da estátua do “Pensador” de August Rodin. Autor: Walké. Wikimedia Commons.

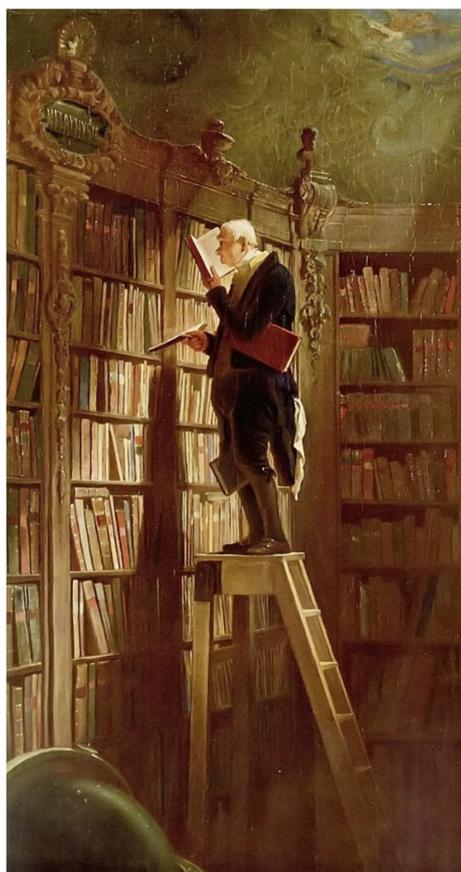
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há um ano atrás, antes de iniciar este projecto experimental, o meu conhecimento sobre o modelo de monocrotalina limitava-se aos dados teóricos disponíveis na literatura.

O processo de familiarização a um novo modelo nem sempre foi simples, mas acabou por ser um caminho de desafio e descoberta. Muito do percurso foi feito por tentativas, acertos e desacertos. Aprendi com os passos bem sucedidos, mas também com os erros.

Analisando retrospectivamente, reconheço a importância de agora estar confortável, não só com um modelo que espero vir a utilizar em investigação futura, mas também com uma série de técnicas (ex. ecocardiografia em pequenos animais de laboratório) que acredito virem a ser ferramentas importantes no trajecto que pretendo vir a traçar.

12. BIBLIOGRAFIA



12. BIBLIOGRAFIA

1. Sauvageau S, Thorin E, Villeneuve L, Dupuis J. Endothelin-3-dependent pulmonary vasoconstriction in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Peptides* 2008; 29: 2039-45.
2. Kwapiszewska G, Wygrecka M, Marsh LM, Schmitt S, Trösser R, Wilhelm J, Helmus K, Eul B, Zakrzewicz A, Ghofrani HA, Schermuly RT, Bohle RM, Grimminger F, Seeger W, Eickelberg O, Fink L, Weissmann NM. Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension. *Circulation* 2008; 118: 1183-1194.
3. Thébaud B, de Lagausie P, Forgues D, Aigrain Y, Mercier JC, Dinh-Xuan AT. ET(A)-receptor blockade and ET(B)-receptor stimulation in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L923-32.
4. de Buys Roessingh AS, de Lagausie P, Barbet JP, Mercier JC, Aigrain Y, Dinh-Xuan AT. Role of ATP-dependent potassium channels in pulmonary vascular tone of fetal lambs with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res* 2006; 60: 537-42.
5. Deruelle P, Grover TR, Abman SH. Pulmonary vascular effects of nitric oxide-cGMP augmentation in a model of chronic pulmonary hypertension in fetal and neonatal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 289: L798-L806.

6. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaineet S. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 40S-47S.
7. Ferreira P. Hipertensão pulmonar. In: *Conceitos básicos de Cardiologia Pediátrica. Serviço de Cardiologia Pediátrica de Coimbra* (eds). Mar da Palavra; 2009: 205-219.
8. Rondelet B, Naeije R. Pathophysiology of pulmonary arterial hypertension associated with Congenital Heart Disease. In: *Pulmonary arterial hypertension related to congenital heart disease*. Beghetti M, Barst RJ, Naeije R, Rubin L (eds). Elsevier; 2006:19-45.
9. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2007; 30: 104–109.
10. Benza RL. Pulmonary hypertension associated with sickle cell disease: pathophysiology and rationale for treatment. *Lung* 2008;186:247-54.
11. Kumar U, Ramteke R, Yadav R, Ramam M, Handa R, Kumar A. Prevalence and predictors of pulmonary artery hypertension in systemic sclerosis. *Assoc Physicians India* 2008; 56: 413-7.
12. Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:5S-12S.

13. Natali D, Simonneau G, Humbert M, Montani D. Investigation of pulmonary hypertension. *Rev Pneumol Clin*. 2008; 64:151-61.
14. Galiè N, Torbicki A, Barst R, Dartevielle P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G, Priori SG, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Burgos EF, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, McGregor K, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Barbera JA, Gibbs S, Hoeper M, Humbert M, Naeije R, Pepke-Zaba J. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25:2243-78
15. Schannwell CM, Steiner S, Strauer BE. Diagnostics in pulmonary hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58:591-602.
16. Montani D, Jaïs X, Sitbon O, Capron F, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension. *Rev Mal Respir* 2005; 22:651-66.
17. Montani D, Jaïs X, Ioss V, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Treatments for pulmonary arterial hypertension. *Rev Med Interne* 2004; 25:720-31.
18. Barst RJ, Gibbs JS, Ghofrani HA, Hoeper MM, McLaughlin VV, Rubin LJ, Sitbon O, Tapson VF, Galiè N. Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:S78-84.

19. Benedict N, Seybert A, Mathier MA. Evidence-based pharmacologic management of pulmonary arterial hypertension. *Clin Ther* 2007; 29: 2134-53.
20. Zhao L., Mason N. A., Morrell N. W., Kojonazarov B., Sadykov A., Maripov A., Mirrakhimov M. M., Aldashev A., Wilkins M. R. Sildenafil Inhibits Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2001; 104: 424-428.
21. Cuifen Z, Lijuan W, Li G, Wei X, Zhiyu W, Fuhai L. Changes and distributions of peptides derived from proadrenomedullin in left-to-right shunt pulmonary hypertension of rats. *Circ J* 2008; 72: 476-81.
22. Qi JG, Li XH, Ding YG, Tang CS, Du JB. Alterations of proadrenomedullin N-terminal 20-peptide in rats with pulmonary hypertension induced by high pulmonary blood flow. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2007;9:574-6.
23. Perkett EA, Brigham KL, Meyrick B. Continuous air embolization into sheep causes sustained pulmonary hypertension and increased pulmonary vasoreactivity. *Am J Pathol* 1988;132(3): 444-54.
24. Perkett EA, Brigham KL, Meyrick B. Granulocyte depletion attenuates sustained pulmonary hypertension and increased pulmonary vasoreactivity caused by continuous air embolization in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 456-65.
25. Perkett EA, Brigham KL, Meyrick B. Increased vasoreactivity and chronic pulmonary hypertension following thoracic irradiation in sheep. *J Appl Physiol* 1986; 61: 1875-81..

26. Meyrick B, Brigham KL. Repeated *Escherichia coli* endotoxin-induced pulmonary inflammation causes chronic pulmonary hypertension in sheep. Structural and functional changes. *Lab Invest* 1986; 55(2): 164-76.
27. Naeije R, Dewachter L. Modèles animaux d'hypertension artérielle pulmonaire. *Rev Mal Respir* 2007; 24: 481-96.
28. Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Roncon-Albuquerque Jr R, Baptista MJ, Lourenco AP, Oliveira SM, Brandao-Nogueira A, Teles A, Fortunato JM, Leite-Moreira AF. Endogenous production of ghrelin and beneficial effects of its exogenous administration in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H2885 - H2890.
29. Falcao-Pires I, Goncalves N, Henriques-Coelho T, Moreira-Goncalves D, Roncon-Albuquerque Jr R, Leite-Moreira AF. Apelin decreases myocardial injury and improves right ventricular function in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H2007 - H2014.
30. Kanno S, Wu Y-J L, Lee PC, Billiar TR, Ho C. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Preserves p21 and Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circulation* 2001; 104: 945 - 950.
31. Csiszar A, Labinsky N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, Hu F, Ballabh P, Podlutzky A, Losonczy G, de Cabo R, Mathew R, Wolin MS, Ungvari Z. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension* 2009; 54:668-75.

32. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:39-45.
33. Clozel M, Hess P, Rey M, Iglarz M, Binkert C, Qiu C. Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231:967-73.
34. Schultze AE, Roth RA. Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1998;1:271-346.
35. Smallhorn JF. The echocardiographic assessment of pulmonary arterial hypertension. In: *Echocardiography in Pediatric and Congenital Heart Disease – From Fetus to Adult*. Lai W, MertensL, Cohen M, Geva T (eds). Wiley-Blackwell 2009; 754 – 764.
36. Lai W, KoH. The normal pediatric echocardiogram. In: *Echocardiography in Pediatric and Congenital Heart Disease – From Fetus to Adult*. Lai W, MertensL, Cohen M, Geva T (eds). Wiley-Blackwell 2009; 754 – 764.
37. Bossone E, Bodini B, Mazza A et al. Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2005;127:1836-1843.
38. Ryan T, Petrovic O, Dillon JC, Feigenbaum H, Conley MJ, Armstrong WF. An echocardiographic index for separation of right ventricular volume and pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5:918-27.

39. Ghio S, Klersy C, Magrini G, D'Armini AM, Scelsi L, Raineri C, Pasotti M, Serio A, Campana C, Viganò M. Prognostic relevance of the echocardiographic assessment of right ventricular function in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol* 2008 Dec 11 [Epub ahead of print].
40. Zeineh NS, Champion HC. Utility of tricuspid annular plane systolic excursion in the assessment of right ventricular function. *PVRI Review* 2010; 2:17-21.
41. Watson LE, Sheth M, Denyer RF, Dostal DE. Baseline echocardiographic values for adult male rats. *J Am Soc Echocardiogr* 2004; 17:161-167.
42. Brown L, Fenning A, Chan V, Loch D, Wilson K, Anderson B, Burstow D. Echocardiographic assessment of cardiac structure and function in rats. *Heart Lung Circ* 2002; 11:167-73.
43. Bjornerheim R, Kiil Groggaard H, Kjekshus H, Attramadal H, Smiseth OA. High frame rate Doppler echocardiography in the rat: an evaluation of the method. *Eur J Echocardiography* 2001; 2:78-87.
44. Jones JE, Mendes L, Rudd MA, Russo G, Loscalzo J, Zhang YY. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:H364-71.
45. Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hemnes AR, Borlaug BA, Chamera E, Corretti MC, Champion HC, Abraham TP, Girgis RE, Hassoun PM. Tricuspid annular displacement predicts

- survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:1034-41.
46. Grapsa I, Pavlopoulos H, Dawson D, Gibbs JS, Nihoyannopoulos P. Retrospective study of pulmonary hypertensive patients: is right ventricular myocardial performance index a vital prognostic factor? *Hellenic J Cardiol.* 2007; 48:152-60.
47. Raymond RJ, Hinderliter AL, Willis PW, Ralph D, Caldwell EJ, Williams W, Ettinger NA, Hill NS, Summer WR, de Boisblanc B, Schwartz T, Koch G, Clayton LM, Jöbsis MM, Crow JW, Long W . Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1214-9.
48. Hardziyenka M, Campian ME, de Bruin-Bon HA, Michel MC, Tan HL. Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat. *J Am Soc Echocardiogr* 2006;19:1272-9.
49. Daicho T, Yagi T, Abe Y, Ohara M, Marunouchi T, Takeo S, Tanonaka K. Possible involvement of mitochondrial energy-producing ability in the development of right ventricular failure in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *J Pharmacol Sci* 2009; 111:33-43.
50. Perazzo J, Eizayaga F, Romay S, Bengochea L, Pavese A, Lemberg A. An experimental model of liver damage and portal hypertension induced by a single dose of monocrotaline. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:432-5.