

**IGOR BASTOS POLONIO**

**Comparação de dois modelos experimentais de hipertensão pulmonar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Pneumologia  
Orientador: Prof. Dr. Rogério de Souza

**São Paulo**

**2012**

---

**DEDICATÓRIAS**

---

## DEDICATÓRIAS

---

À meus pais, exemplos de vida, sem eles nada disso seria possível. Meu pai Wilson Alves Polonio, que me incentivou no estudo desde criança, que é meu herói e meu exemplo de homem de caráter. Minha mãe, Maria Izabel Bastos Polonio, mulher de fibra, de sensibilidade e doçura incomparáveis. É com ela que aprendi a cantar as melodias da vida.

À minha esposa Karine Simone, companheira de todas as horas, que sempre mostrou seu amor, mesmo nas horas mais difíceis. Aprendi que sempre ao lado de um grande homem, existe uma grande mulher. Ela me ensina a ser um grande homem e me estimula com seu incentivo e carinho.

À minha filhinha amada, Martina, que é o bálsamo da minha existência. Que eu possa sempre abraça-la e ensiná-la tudo o que aprendi. Ela nasceu durante o desenvolvimento desta tese. É a maior alegria e inspiração que tenho na vida.

---

## **AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Souza, que me recebeu no InCor e foi o grande idealizador e incentivador deste trabalho pioneiro. Ele me fez acreditar que isto seria possível e me inspirou com sua inteligência e talento.

Ao Prof. Dr. Roberto Stirbulov, que sempre me incentivou na carreira médica, me ensinando a pneumologia como o pai ensina ao filho. Parafraseando Hipócrates, estimo como meus pais aqueles que me ensinaram esta arte. Foi o Prof. Stirbulov que me incentivou a seguir esta área, quando me apresentou ao Prof. Rogério.

Ao grande mestre Dr. Jorge Ethel Filho, que com seu exemplo e sua energia inspiradora me atraiu para a pneumologia. Suas gargalhadas sempre ecoarão em meu coração.

À Dra. Milena Acencio, que com sua paciência e disposição me ensinou muito durante o desenvolvimento do trabalho no laboratório de Pleura da Disciplina de Pneumologia da FMUSP.

Ao Carlos, Vanessa, Ricky, Bárbara e Karina que me ajudaram no desenvolvimento do trabalho no laboratório de pleura. Com paciência e disposição, me ensinaram os segredos da bancada do laboratório.

À Prof. Dra. Lisete Teixeira e a Prof. Dra Leila Antonangelo, por permitirem o uso das instalações do laboratório de Pleura para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Rogério Pazetti, que me ajudou com muita paciência e bom humor a operar os animais. Sempre disposto e com paciência infinita.

À Dra Francine, que me ajudou, junto com o Dr Pazetti a manusear os animais. É muito difícil mexer com os animais. Eles me ensinaram a ter coragem e disposição.

Ao Dr. Mauro Canzian, patologista do InCor, pela sua imprescindível ajuda com a análise histológica.

À todos os Professores da pós-graduação. Sem eles não teria sido possível. Seus ensinamentos não foram só para a realização do Doutorado, mas para o exercício da pneumologia.

Ao Prof. Dr. Francisco Vargas, por permitir o meu ingresso no Doutorado da FMUSP.

À todos os funcionários da Pneumologia do InCor. Sem eles também não seria possível.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro, através do Projeto Universal.

## **NORMALIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

---

## SUMÁRIO

---



## SUMÁRIO

---

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

RESUMO

SUMMARY

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Definição de Hipertensão Pulmonar.....	1
1.2 <i>Crotalaria</i> .....	2
1.3 Hiperfluxo pulmonar.....	4
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1 Animais de estudo.....	7
3.2 Técnica de Pneumectomia.....	8
3.3 Rotina de Análise.....	14
3.4 Medidas hemodinâmicas.....	15
3.5 Dosagem dos Marcadores inflamatórios.....	19
3.6 Estudo de Sobrevida.....	20
3.7 Análise estatística.....	21
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
4.1 Pressão de Artéria Pulmonar Média.....	22
4.2 Peso do Ventrículo Direito.....	23

4.3	Peso do Ventrículo Esquerdo + Septo.....	24
4.4	Ventrículo Direito/ Ventrículo Esquerdo + Septo.....	25
4.5	Área da Camada Média.....	26
4.6	Interleucina -1.....	27
4.7	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas.....	28
4.8	Curva de Sobrevida.....	29
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## **APÊNDICE**

## Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

C	Grupo controle
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima
et al.	e outros
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HAP	Hipertensão Arterial Pulmonar
IL-1	Interleucina -1
M	Grupo monocrotalina
$\mu^2$	Micrômetro quadrado
$\mu\text{L}$	Microlitro
mg/kg	Miligramas por quilo
ml/kg	Mililitros por quilo
mmHg	Milímetros de Mercúrio
P	Grupo pneumonectomia
PAPm	Pressão média de Artéria Pulmonar
PBS	Solução tampão de fosfato isotônica
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
pg/ml	Picogramas por mililitro

PM	Grupo pneumonectomia + monocrotalina
S	Septo
VD	Ventrículo Direito
VD/VE + S	Relação do peso do ventrículo direito sobre o peso do ventrículo esquerdo + septo
VE	Ventrículo Esquerdo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anestesia em câmara de isoflurano a 2,5 %.....	9
Figura 2. Intubação orotraqueal.....	10
Figura 3. Ventilação mecânica e anestesia geral.....	11
Figura 4. Toracotomia esquerda.....	12
Figura 5. Exposição do hilo pulmonar.....	13
Figura 6. Dreno e respiração espontânea.....	14
Figura 7. Dissecção da jugular.....	15
Figura 8. Exposição da jugular.....	16
Figura 9. Inserção do cateter na veia jugular externa.....	17
Figura 10. Visualização do traçado e obtenção das medidas hemodinâmicas.....	18
Figura 11. Comparação da Pressão média de artéria pulmonar (mmHg).....	22
Figura 12. Comparação do peso do VD em gramas.....	23
Figura 13. Comparação do peso do Ventrículo Esquerdo + Septo (VE+Septo) em gramas.....	24

Figura 14. Comparação da relação do peso do VD sobre peso do VE + S.....	25
Figura 15. Comparação da área da camada média das artérias pulmonares.....	26
Figura 16. Cortes histológicos da camada média de arteríolas acinares.....	27
Figura 17 .Comparação dos níveis de interleucina-1 (pg/mL).....	28
Figura 18. Comparação dos níveis de PDGF (pg/ml).....	29
Figura 19. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier.....	30

---

**RESUMO**

---

## RESUMO

---

Polonio IB. *Comparação de dois modelos experimentais de hipertensão pulmonar*. [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

**Objetivos:** Comparar dois modelos de hipertensão pulmonar (monocrotalina isoladamente e pneumonectomia com monocrotalina) em relação à gravidade hemodinâmica, estrutura das artérias pulmonares, marcadores inflamatórios - interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) - e sobrevida em 45 dias.

**Métodos:** Total de 80 animais analisados em 2 protocolos de estudo: análise estrutural e análise de sobrevida. Foram divididos em 4 grupos [controle (C), monocrotalina (M), Pneumonectomia com monocrotalina (PM) e pneumonectomia (P)]. Após 28 dias, os animais foram cateterizados, sendo obtidos os valores hemodinâmicos. Após foram sacrificados, sendo obtidos os tecidos cardíaco e pulmonar. O ventrículo direito (VD) foi dissecado do septo interventricular e a relação do seu peso sobre o peso do ventrículo esquerdo (VE+S) com o septo foi obtida como índice de hipertrofia de VD. No tecido pulmonar foram realizadas as análises histológicas (área da camada média das artérias pulmonares) e dosados os peptídeos IL-1 e PDGF através da técnica de ELISA. Para o estudo de sobrevida os animais foram observados por 45 dias.



**Resultados:** Os grupos M e PM apresentaram hipertensão pulmonar em relação aos demais. Houve aumento significativo da relação VD/VE+S no grupo PM em relação aos demais. Não houve diferença significativa entre os grupos M e PM na área da camada média das artérias pulmonares, nas dosagem de IL-1 e PDGF e na sobrevida.

**Conclusões:** Com os resultados obtidos não podemos afirmar que o modelo de pneumonectomia com monocrotalina é superior ao modelo de monocrotalina.

*Descritores:* monocrotalina, hipertensão pulmonar, pneumonectomia.

---

**SUMMARY**

---

## SUMMARY

---

Polonio IB. *Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension*. [Thesis]. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012

**Objectives:** To compare two models of pulmonary hypertension (monocrotaline and pneumonectomy with monocrotaline alone) in relation to the hemodynamic severity, structure of the pulmonary arteries, inflammatory markers - interleukin-1 (IL-1) factor and platelet-derived growth factor (PDGF) - and survival at 45 days.

**Methods:** Total of 80 animals were analyzed in two study protocols: structural analysis and survival analysis. They were divided into four groups [control (C), monocrotaline (M), Pneumonectomy with monocrotaline (PM) and pneumonectomy (P)]. After 28 days, the animals were catheterized, and the hemodynamic values obtained. Then, they were euthanized and obtained the heart and lung tissues. The right ventricle (RV) was dissected from the interventricular septum and the ratio of its weight on the weight of the left ventricle (LV + S) with the septum was obtained as an index of RV hypertrophy. In lung tissue histological analyzes were performed (area of the middle layer of the pulmonary arteries) and the peptides IL-1 and PDGF measured by ELISA. To the survival study, the animals were observed for 45 days.

**Results:** The groups M and PM show pulmonary hypertension in relation to the others. A significant increase in the RV / LV + S was observed in PM in relation to M, and M and PM in relation to the others. There was no significant difference between groups M and PM in the medial layer of pulmonary arteries, the dose of IL-1 and PDGF, and survival.

**Conclusions:** The results obtained can not say that pneumonectomy with monocrotaline model is superior to monocrotaline model.

*Keywords:* monocrotaline, pulmonary hypertension, pneumonectomy.

---

## INTRODUÇÃO

---

## INTRODUÇÃO

---

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma entidade composta por diversas doenças, que apresentam semelhanças patológicas, porém divergem na fisiopatologia e no prognóstico [1]. Clinicamente caracteriza-se por sintomas de dispnéia, dor torácica e síncope, causando limitação progressiva, insuficiência cardíaca direita e morte [2,3]. A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença rara, quando na sua forma idiopática, com incidência mais freqüente na quarta década de vida, afetando principalmente mulheres[1,4-8].

A HAP, segundo o 4º. Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar [9], realizado em Dana Point, é definida através do cateterismo cardíaco direito demonstrando a presença de pressão de artéria pulmonar média maior ou igual a 25 mmHg com pressão de oclusão da artéria pulmonar menor ou igual a 15 mmHg.

A HAP é resultado de alterações complexas que levam a modificações estruturais das artérias e arteríolas pulmonares levando ulteriormente às manifestações clínicas da doença. A progressão das alterações vasculares geralmente ocorre após um ou mais estímulos agressores em um indivíduo suscetível e hoje, apesar dos medicamentos disponíveis para o tratamento, a HAP ainda é uma doença fatal [10,11].

Os modelos experimentais para o estudo da HAP permitiram o desenvolvimento de todas as alternativas terapêuticas existentes atualmente, sendo que o modelo baseado na utilização da monocrotalina (substância derivada das plantas do gênero *Crotalaria*) é o mais utilizado até os dias atuais [12-17].

As plantas do gênero *Crotalaria* pertencem a família Leguminosae, com mais de seiscentas espécies, sendo encontradas com frequência em regiões tropicais e subtropicais [18]. Ocorrem principalmente na África, Índia, México e Brasil. São plantas herbáceas ou arbustos, podendo variar de 50 cm até 3 m de altura. Ocorrem em variados ambientes e em ambientes de campo e beira de estradas, podendo ser invasoras de culturas. No Brasil, as plantas têm o nome popular de chocalho de cascavel, devido a suas vagens secas que quando tocadas produzem um som semelhante ao guizo da cascavel. Sua importância econômica se dá através da adubação verde, sendo utilizadas para preparo e enriquecimento do solo para plantio posterior. Como crescem em meio a pastagens também podem provocar prejuízos econômicos, devido à intoxicação eventual de animais que podem consumi-la[18].

O uso das sementes de *Crotalaria Spectabilis*, planta da qual deriva a substância monocrotalina, foi descrita há mais de 40 anos. Inicialmente, os animais eram alimentados com as sementes, desenvolvendo hipertensão pulmonar posteriormente [19]. Atualmente se utiliza a administração subcutânea da monocrotalina, que após oxidação no fígado, gerando seu

metabólito pirrólico, atinge o pulmão onde deflagra lesões na circulação pulmonar, tendo como alvo diversas proteínas e peptídeos do endotélio vascular [20].

Após 4 horas da administração da substância, já se pode observar aumento relativo da camada média de artérias pulmonares intra-acinares, devido à contração muscular. Oito a dezesseis horas após a administração, observa-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear na adventícia de artérias e veias, configurando uma vasculite. Após cerca de 22 dias, há hipertrofia ventricular direita e vasculite mononuclear importante em artérias e veias intra-acinares [21]. Desta forma, após provocar uma reação inflamatória intensa nas artérias e arteríolas pulmonares, tem início o processo de remodelação vascular principalmente associado ao espessamento da camada média [22,23]. Em virtude desses achados, vários autores têm estudado o efeito da monocrotalina na circulação pulmonar de ratos e sua associação com diferentes intervenções [12-17, 24-27].

Por sua simplicidade, é um modelo muito utilizado para teste de novas drogas, mas é extensa a lista de drogas que reverte a hipertensão pulmonar do modelo, mesmo aquelas que podem causar hipertensão pulmonar em seres humanos, paradoxalmente [28]. Assim, o problema deste modelo é que não representa de modo fidedigno todas as alterações que ocorrem na HAP dos seres humanos, principalmente por não apresentar proliferação endotelial significativa [10]. Conseqüentemente, outros modelos têm sido estudados, como por exemplo a associação da injeção de monocrotalina



com hiperfluxo pulmonar, este último derivado de shunts sistêmico-pulmonares ou de pneumonectomia [29-31].

Em 1996, Tanaka et al. [29], testaram a hipótese de que, aumentando as pressões nas artérias pulmonares até níveis sistêmicos, os efeitos da monocrotalina na circulação pulmonar poderiam ser aumentados. Através de uma ligação da artéria subclávia com a artéria pulmonar em ratos, com injeção posterior de monocrotalina, foi observado que grandes artérias pulmonares apresentaram lesão da camada íntima. Depois os autores demonstraram que na ausência de lesão endotelial, mesmo submetidos a pressões sistêmicas, não houve remodelamento vascular, pelo menos em grandes vasos.

Em estudo posterior [30], os autores realizaram a pneumonectomia esquerda, injetando monocrotalina. Observaram a presença de lesões na camada íntima das artérias pulmonares distais, fato atribuído ao aumento de fluxo nas artérias do pulmão remanescente. Eles fizeram a hipótese de que o estresse de cisalhamento (“shear stress”) foi responsável pelas alterações observadas. Os estudos destes investigadores, assim como estudos conduzidos em outras espécies animais, mostraram que, na ausência de lesão endotelial, o aumento do fluxo sanguíneo após a pneumonectomia, não provoca aumentos significativos nos níveis pressóricos da artéria pulmonar [31]. Estudos histológicos em humanos, 1 a 5 anos após a pneumonectomia mostram apenas hipertrofia da média, sem lesões na camada íntima das artérias pulmonares [31].

Assim, observa-se que as alterações histológicas resultantes desses modelos experimentais potencialmente se assemelham mais aos achados característicos da HAP em humanos, particularmente pela maior proliferação neointimal [25-27,29,32].

White et al. [33] compararam o modelo de hipertensão pulmonar gerado por pneumonectomia esquerda mais administração de monocrotalina em ratos mais jovens com as lesões anátomo-patológicas observadas em autópsias de seres humanos com HAP. A hipótese é de que em ratos mais jovens, as alterações observadas por Tanaka et al., seriam ainda mais pronunciadas. Nos ratos houve formação de lesões complexas proliferativas perivasculares. Embora estes relatos sugiram uma superioridade do modelo de monocrotalina associado a hiperfluxo, não existem comparações diretas entre os modelos que permitam determinar a necessidade da associação como modelo a ser utilizado em estudos futuros.

---

**OBJETIVOS**

---

## OBJETIVOS

---

Comparar o modelo de uso isolado de monocrotalina com o modelo de associação de monocrotalina e hiperfluxo (após pneumonectomia esquerda), em ratos adultos, com relação à gravidade hemodinâmica, alterações estruturais das artérias pulmonares, marcadores inflamatórios e sobrevida em 45 dias.

---

## MÉTODOS

---

## MÉTODOS

---

Todos os animais receberam tratamento digno em concordância com normas internacionais de cuidados com os animais [34]. O estudo teve aprovação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O estudo teve apoio financeiro do CNPq (projeto universal).

### **Animais de Estudo**

Foram realizados 2 protocolos de estudo, um para análise estrutural e outro para avaliação da sobrevivência. Em cada um dos estudos foram utilizados 40 ratos Sprague-Dawley com peso de 250g a 300g, divididos igualmente em 4 grupos:

#### **Grupo Controle ( C):**

Os animais deste grupo receberam uma injeção subcutânea de salina (1ml/kg) no D0 do estudo.

#### **Grupo Monocrotalina (M):**

Os animais deste grupo receberam uma injeção subcutânea de monocrotalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (60 mg/kg) no D0 do estudo.

#### **Grupo Pneumonectomia Esquerda (P):**

Os animais deste grupo fizeram pneumonectomia esquerda no D-7 do

estudo. No D0 do estudo receberam injeção subcutânea de salina (1 ml/kg).

### **Grupo Monocrotalina + pneumonectomia esquerda (PM)**

Os animais deste grupo foram submetidos a pneumonectomia esquerda no D -7 do estudo. No D0 do estudo os animais receberam uma injeção subcutânea de monocrotalina (60 mg/kg).

### **Técnica de Pneumonectomia**

Primeiramente os animais foram anestesiados com isoflurano a 2,5%, em câmara anestésica (figura 1), mantido durante a cirurgia; após, foram intubados com cateter jelco® 14G (Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil) [figura 2] e acoplados em um ventilador mecânico de roedores (Harvard modelo 683, Harvard Apparatus Co., South Natick, MA) (Frequência respiratória de 80/ min, volume corrente de 10 ml por quilo de peso) [figura 3]. O animal foi posicionado em decúbito lateral direito, foi feita tricotomia na região infra-axilar esquerda e posteriormente foi feita uma incisão de 3 cm seguindo paralelamente entre o quarto e quinto espaço intercostal [figura 4]. Foram seccionadas a pele, o tecido celular subcutâneo, os planos musculares intercostais até atingir-se a cavidade torácica [figura 5]. Neste ponto foi posicionado o afastador entre as costelas. O pulmão esquerdo foi liberado de seus ligamentos e, posteriormente, tracionado para fora da cavidade. Com uma linha de algodão 2-0 o hilo foi amarrado em bloco e o pulmão esquerdo seccionado. Posteriormente, foram fechados os planos musculares com sutura contínua de fio de nylon 3-0

(ethicon ®, São Paulo, Brasil), e após a pele com o mesmo fio. Posteriormente o animal foi desintubado e deixado com dreno torácico em selo d'água (figura 6).

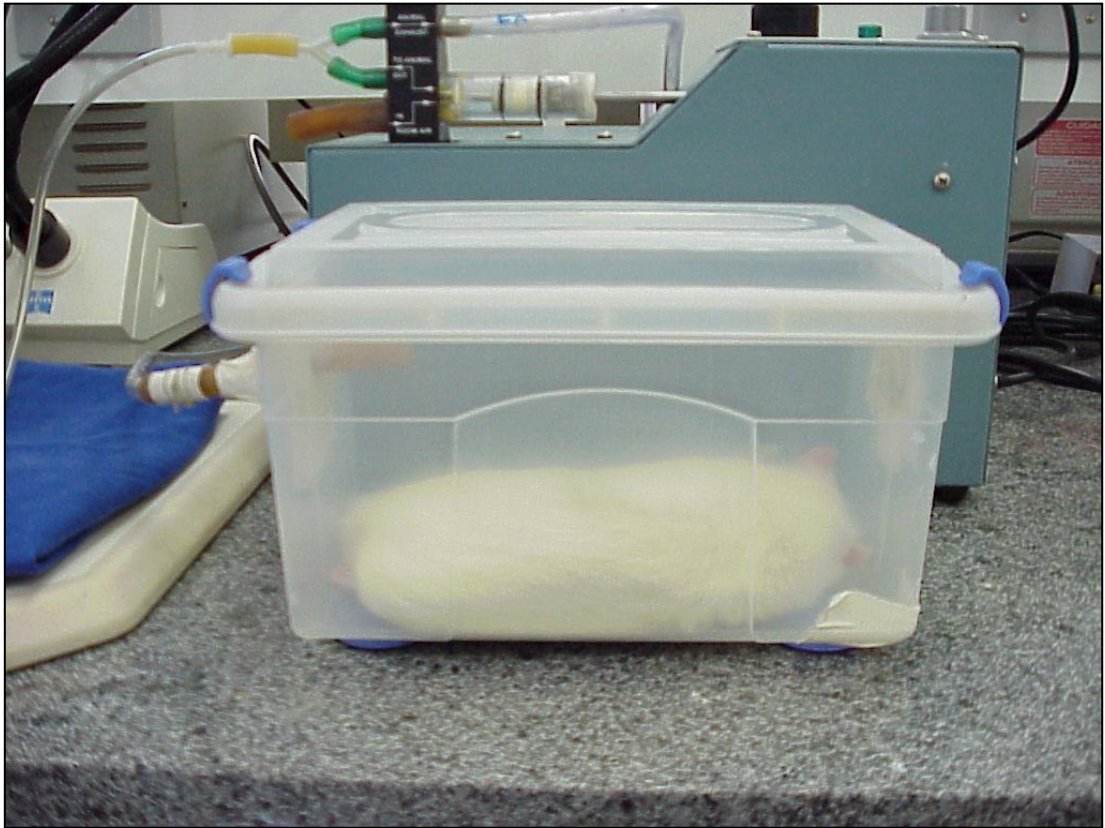


Figura 1. Anestesia em câmara de isoflurano a 2,5 %.



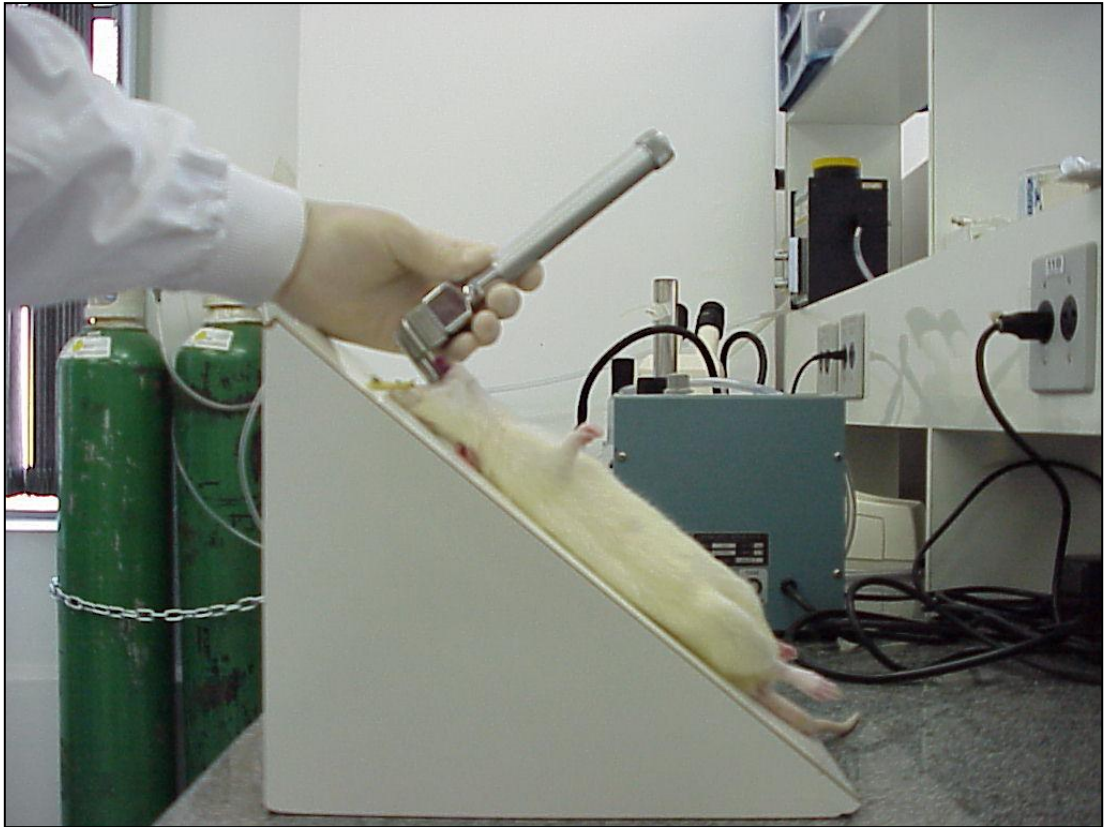


Figura 2. Intubação orotraqueal.



Figura 3. Ventilação mecânica e anestesia geral.

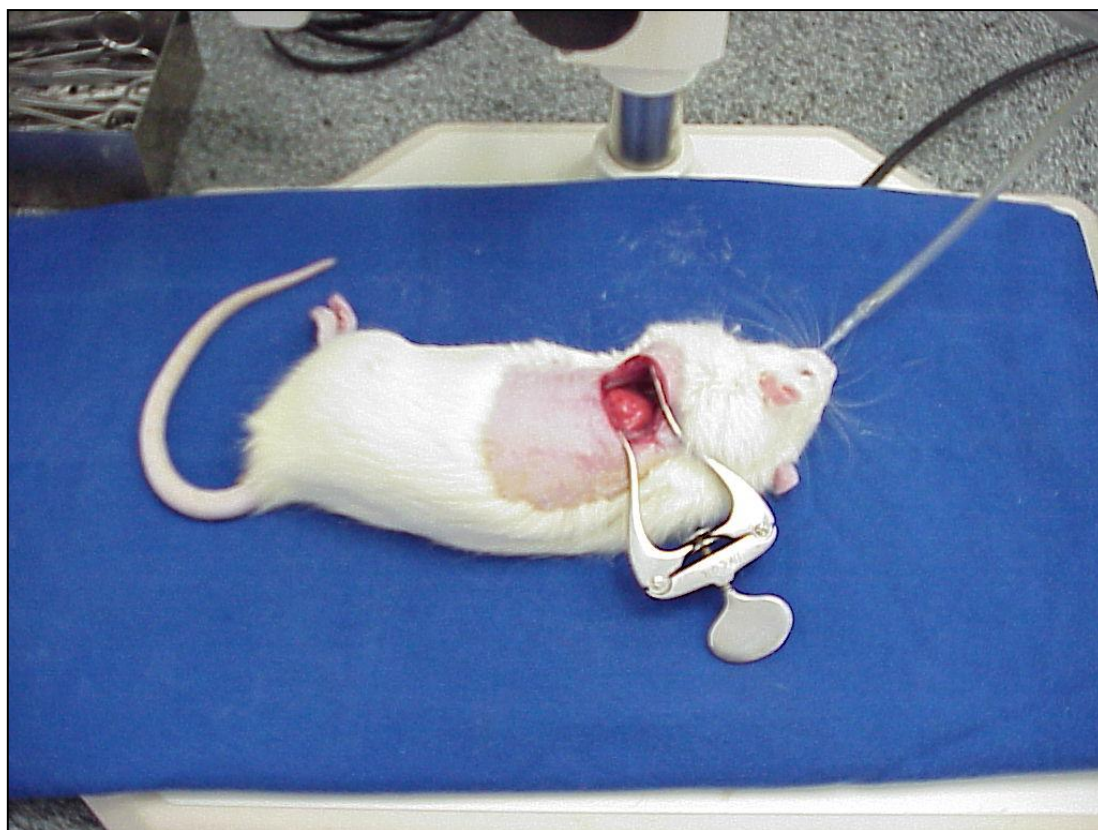


Figura 4. Toracotomia esquerda.

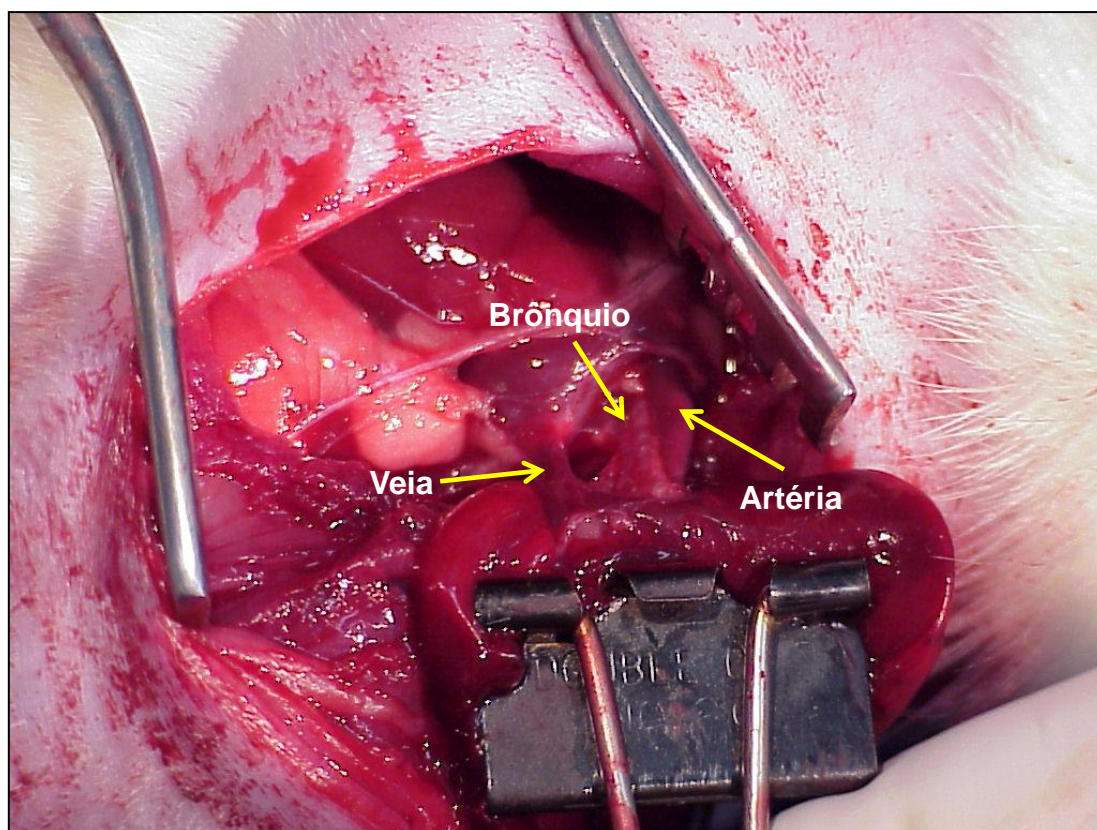


Figura 5. Exposição do hilo pulmonar.

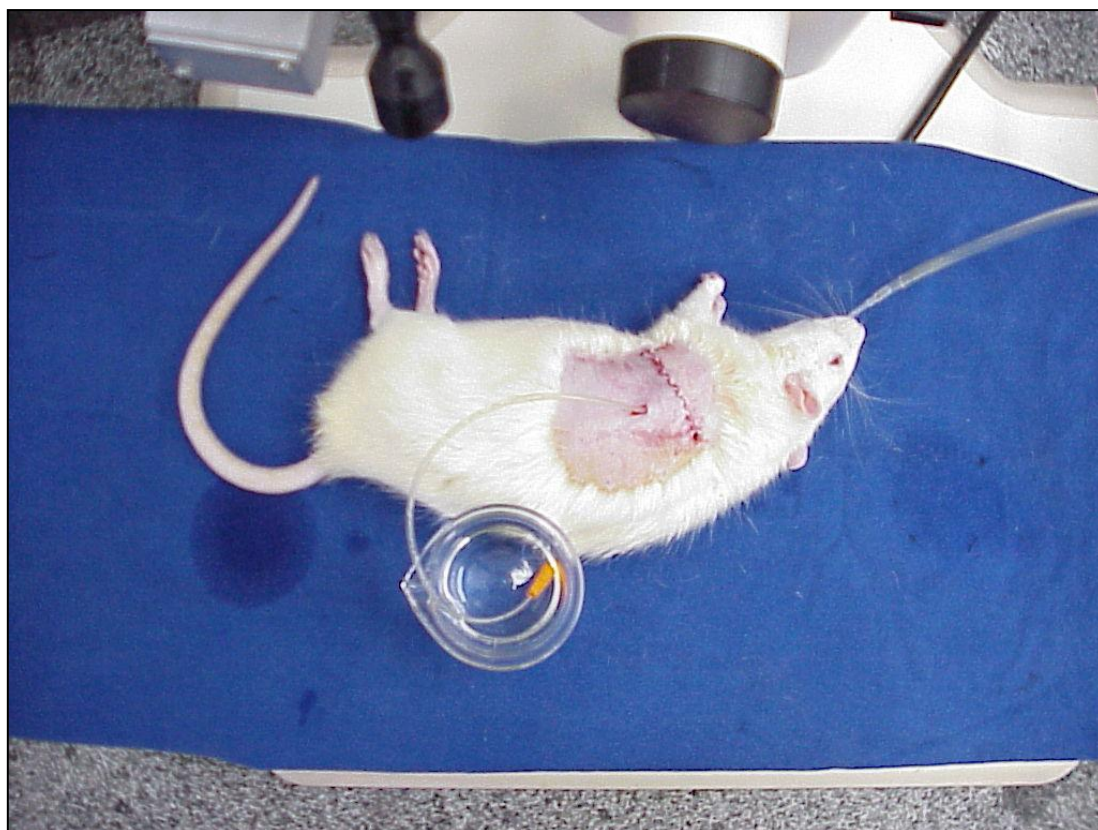


Figura 6. Dreno e respiração espontânea.

### **Rotina de Análise – Estudo Estrutural**

As análises foram realizadas no 28º dia após a injeção de monocrotalina ou salina. Após sedação profunda [cloridrato de xilazina 0,3 mg/kg - Rompun® , (Bayer, Leverkusen, Germany), cloridrato de cetamina 10 mg/kg - ketalar® (Pfizer, New York, USA)] com administração intraperitoneal, os animais foram inicialmente pesados para depois serem realizadas as medidas hemodinâmicas, seguidas do sacrifício através de sangria da aorta abdominal e, por fim, obtenção dos tecidos cardíaco e pulmonar.

### Medidas Hemodinâmicas

As medidas hemodinâmicas foram realizadas através da inserção de um cateter umbilical pela veia jugular externa (figuras 7, 8 e 9) conectado a um transdutor de pressão HP1295C (Hewlett-Packard, CA, USA) ligado a um monitor hemodinâmico HP (Monitox Dx 2020, número de série 1/11083, CA, USA), seguindo a técnica previamente descrita [35]. Através desse sistema foi obtida a pressão média da artéria pulmonar (PAPm) [figura 10].



Figura 7. Dissecção da jugular.

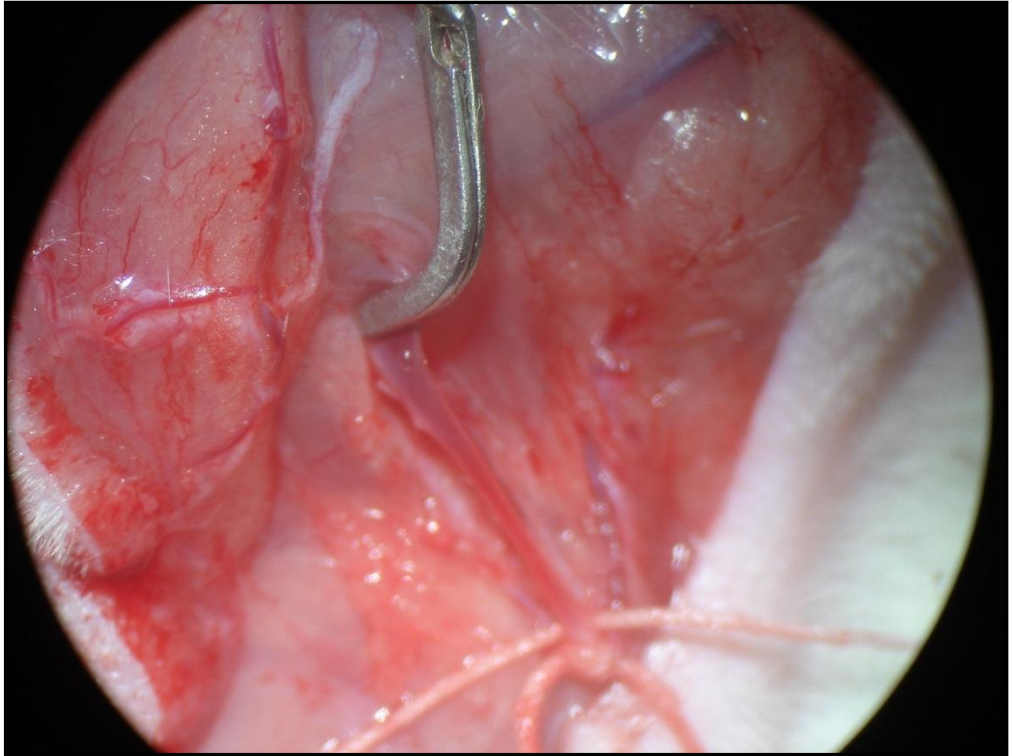


Figura 8. Exposição da jugular.

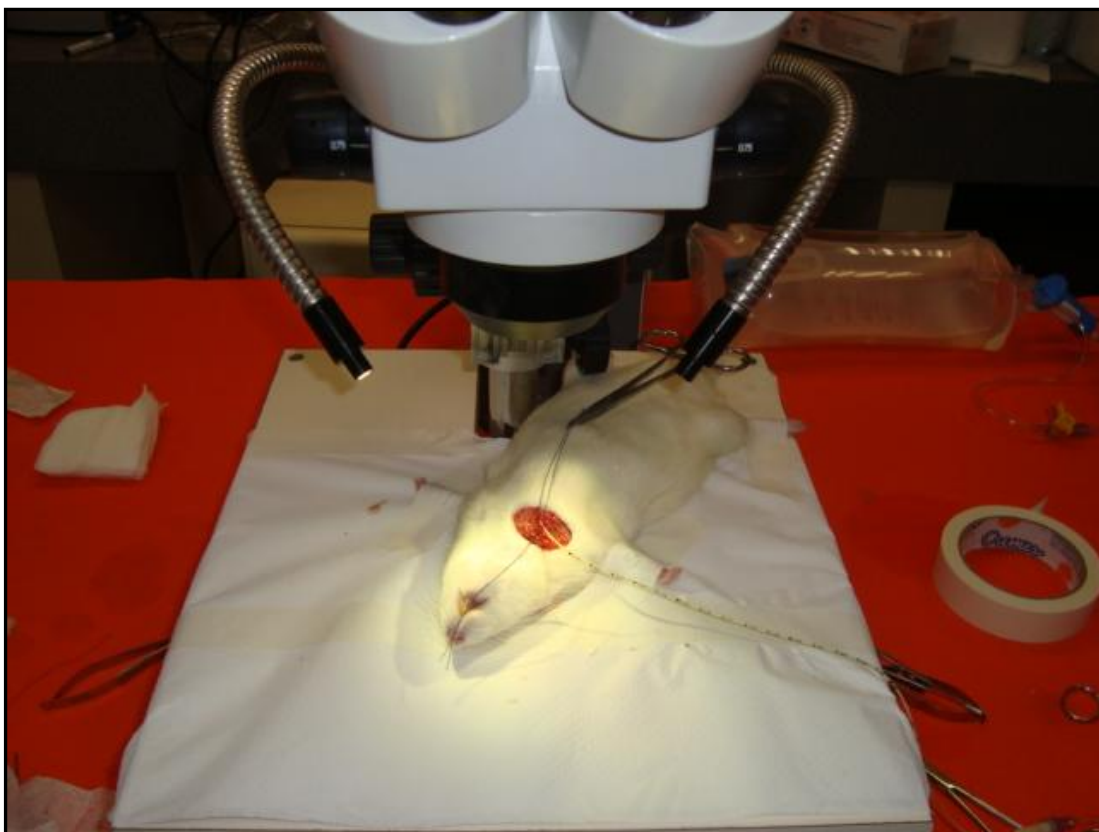


Figura 9. Inserção do cateter na veia jugular externa.





Figura 10. Visualização do traçado e obtenção das medidas hemodinâmicas.

### Hipertrofia Ventricular Direita

O ventrículo direito (VD) foi dissecado do ventrículo esquerdo (VE) que por sua vez manteve o septo interventricular (VE+S). A razão entre o peso do VD sobre o peso do conjunto VE+S foi utilizada como marcador de hipertrofia ventricular direita  $[VD / (VE+S)]$  [26].

### Dosagem dos Marcadores Inflamatórios

Para análise inflamatória, foram determinadas as concentrações de interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Para dosagem dos peptídeos foi utilizado o método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) de captura kit comercial de IL-1 e PDGF anti-rato (R&D System, Inc., Minneapolis, USA) [36,37]. Os peptídeos foram dosados a partir de fragmentos dos pulmões congelados.

Placas com 96 poços (Costar/Corning, Inc., Cambridge, USA) foram sensibilizadas com 100µL de anticorpo monoclonal e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, a placa foi bloqueada, para evitar ligações inespecíficas com 300µL de solução de bloqueio (BSA 2%) e incubada por 2 horas a 37°C. Após o bloqueio, foram adicionados 100µL por poço de amostra e dos padrões diluídos previamente em solução tampão de fosfato isotônica (PBS). Em dois poços foi colocado somente PBS para caracterização do branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C.

Após incubação, foram adicionados 100µL do anticorpo conjugado (biotinilado) na concentração estabelecida e as placas foram incubadas por 3 horas a 37°C. Posteriormente, foram adicionados 100µL de Streptavidina HRP (1:250) por poço e incubado por 30 minutos a 37°C. A cada etapa a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS + Tween 20) por 6 vezes.

A revelação foi realizada através da adição de 100µL da Solução de Revelação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Tetrametilbenzidina) por poço e incubado de 5 a 60

minutos a 37°C de acordo com cada citocina. A reação foi parada com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% por poço e agitado lentamente. A leitura foi feita em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek, USA) utilizando filtro de 450nm.

### **Análise Histológica**

Para a quantificação histológica foram avaliados cinco diferentes campos randomicamente selecionados em aumento de 400X, após o tecido ser submetido a técnica de coloração de Miller, que permite a visualização da elástica. Para a quantificação, utilizamos sistema analisador de imagens modelo Carl Zeiss (Micro Imaging GmbH 37081, Göttingen, Germany), que permite medidas quantitativas geométricas e densitométricas. “Thresholds” específicos foram estabelecidos para cada lâmina. A avaliação histológica foi expressa em área (µm<sup>2</sup>) [38].

### **Estudo de Sobrevida**

O estudo de sobrevida, com 40 ratos também divididos em grupos C, P, M e PM, teve o objetivo de verificar diferenças de sobrevida entre os modelos. Os animais foram observados por 45 dias, sendo computadas a data de óbito de cada rato, tendo sido todos os animais restantes sacrificados no D45.

### **Análise estatística**

As variáveis contínuas foram comparadas, entre os diferentes grupos, através de análise de variância com correção de Bonferroni, como análise pós hoc. A análise das variáveis proporcionais foi realizada através do teste de Chi-quadrado ou do teste exato de Fisher, conforme indicado. Foram considerados significativos, os valores de p menores que 0,05.

A sobrevida ao longo do tempo foi descrita de acordo com o Método de Kaplan-Meier, realizando-se a comparação entre as curvas através do método de log-rank.

---

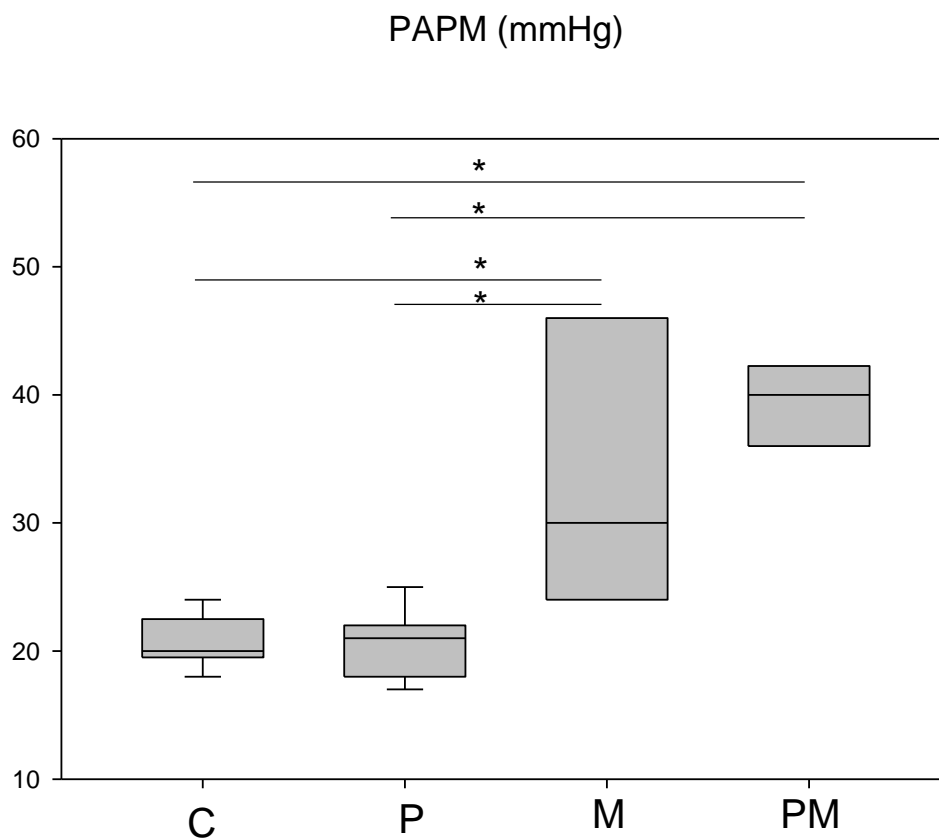
**RESULTADOS**

---

## RESULTADOS

---

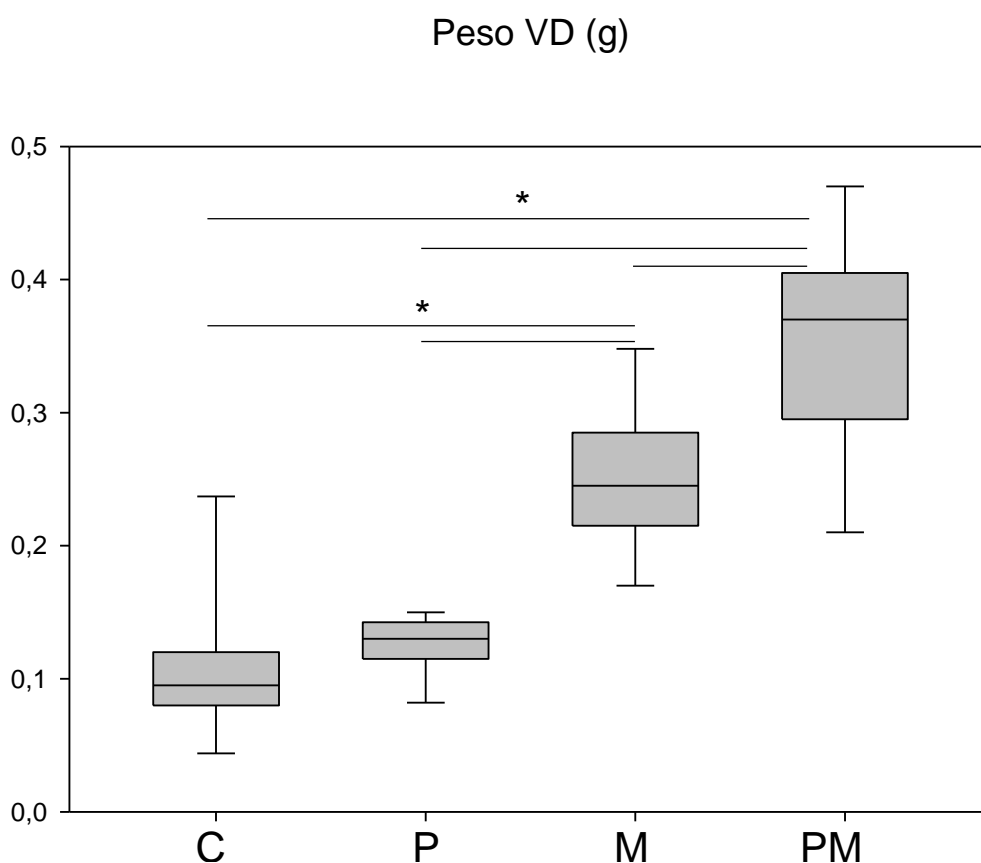
Através das medidas hemodinâmicas invasivas, podemos observar que os grupos M e PM desenvolveram hipertensão pulmonar, enquanto os demais não (figura 11).



**Figura 11. Comparação da Pressão média de artéria pulmonar (mmHg).**

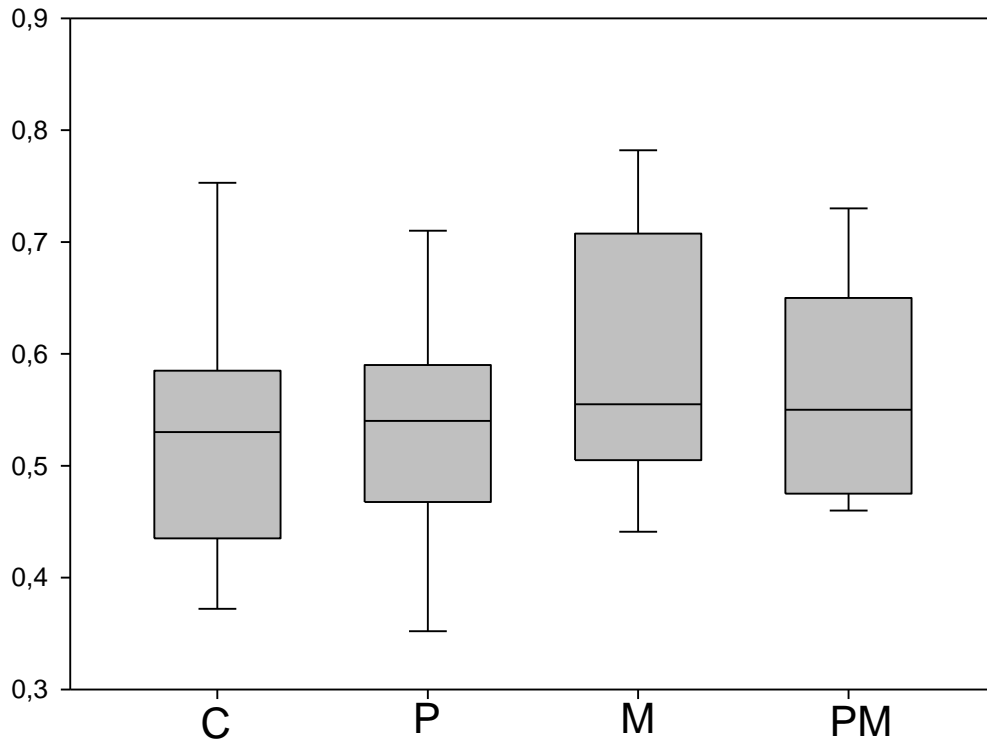
**\*  $p < 0,001$ . C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

O peso do ventrículo direito (VD) foi significativamente maior nos grupos com hipertensão pulmonar em relação aos demais (figura 12), sendo significativamente maior no grupo PM. Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso do ventrículo esquerdo somado ao septo (figura 13), fazendo com que a medida de hipertrofia de VD (relação VD/VE+S) fosse significativamente maior no grupo PM em relação aos demais (figura 14), seguindo a distribuição do peso do VD.



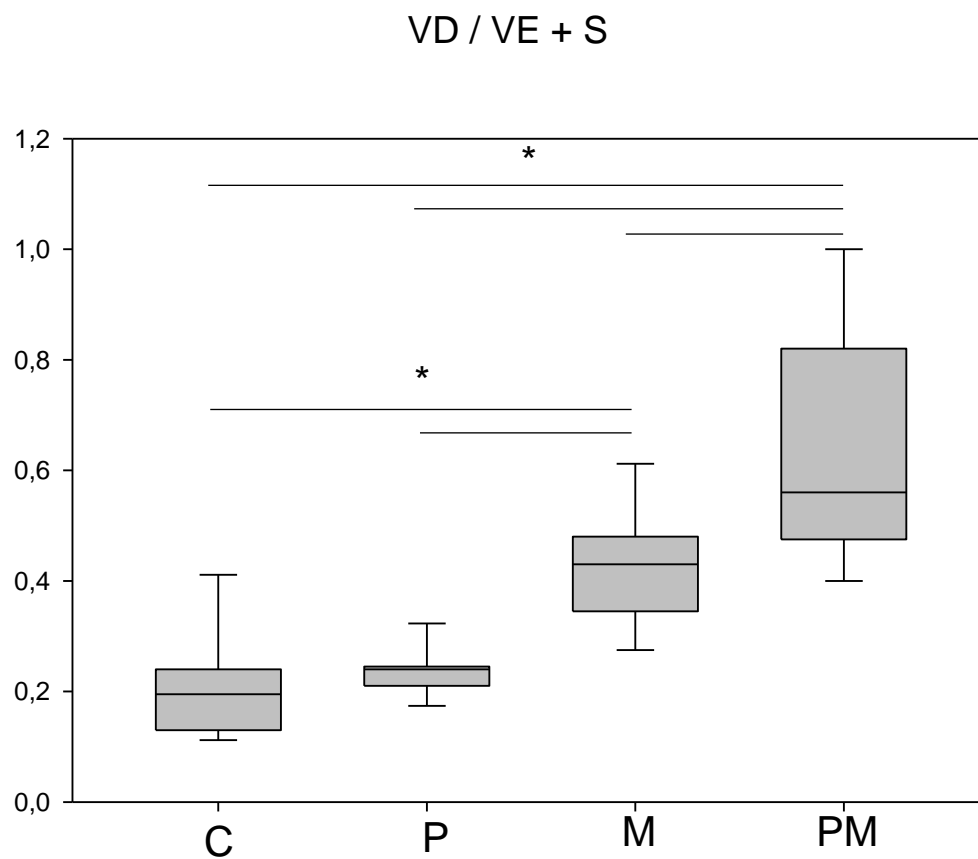
**Figura 12. Comparação do peso do VD em gramas. \*  $p < 0,001$ . C – grupo controle. P – grupo pneumectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumectomia + monocrotalina.**

## VE + Septo (g)



**Figura 13. Comparação do peso do Ventrículo Esquerdo + Septo (VE+Septo) em gramas. C - grupo controle. P - grupo pneumonectomia. M - grupo monocrotalina. PM - grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

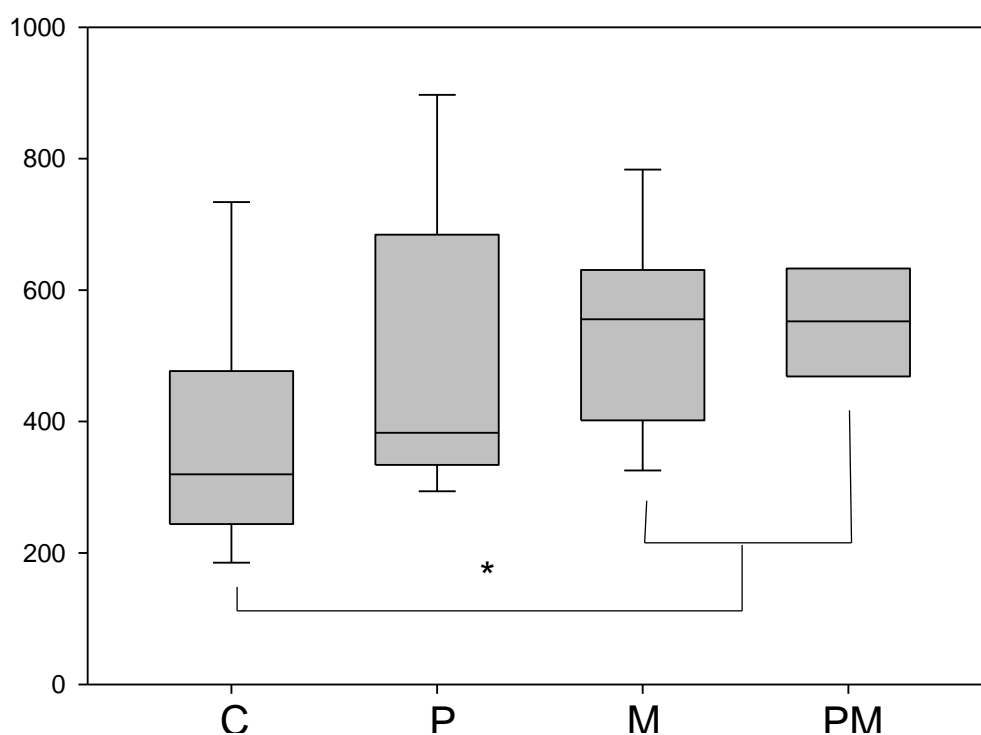




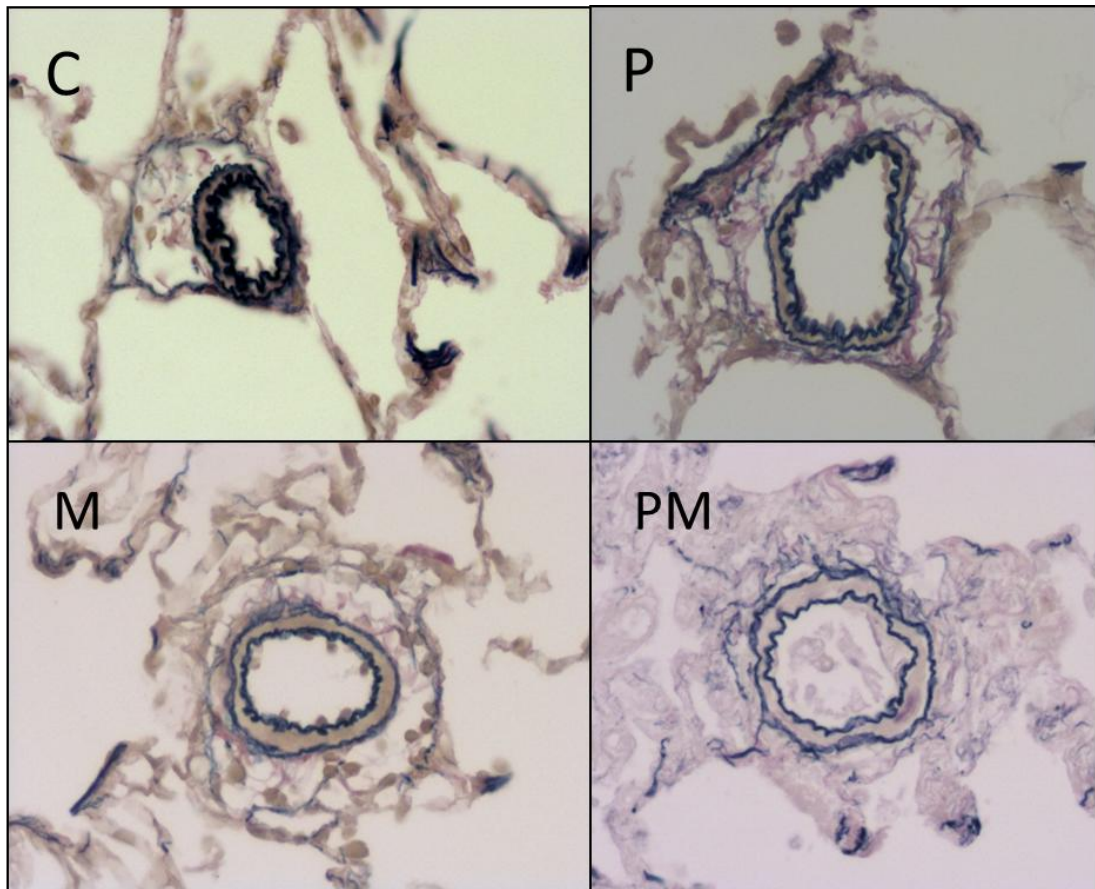
**Figura 14. Comparação da relação do peso do VD sobre peso do VE + S. \*  $p < 0,001$ . C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

A área da camada média dos grupos M e PM foi significativamente maior em relação ao controle ( $p = 0,013$ ), porém não diferiram entre si (figura 15). Não houve proliferação intimal nos grupos M e PM (figura 16).

Área da Camada Média ( $\mu^2$ )



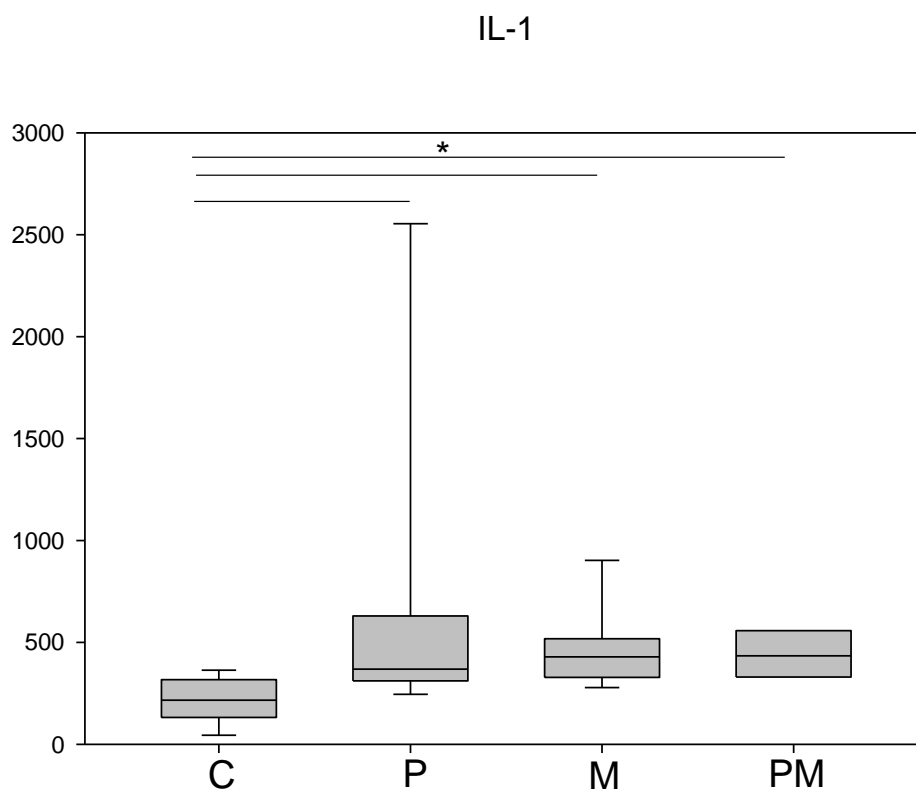
**Figura 15. Comparação da área da camada média das artérias pulmonares. \*  $p = 0,013$ . C - grupo controle. P - grupo pneumonectomia. M - grupo monocrotalina. PM - grupo pneumonectomia + monocrotalina.**



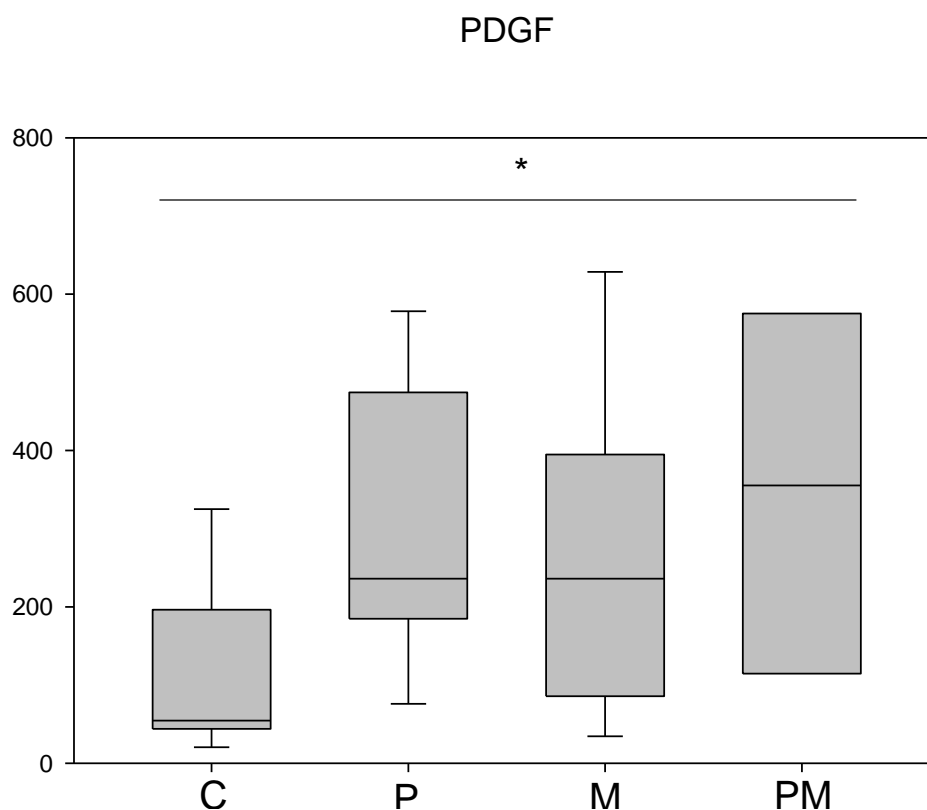
**Figura 16. Cortes histológicos da camada média de arteríolas acinares. C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina. (Aumento: 400x)**

Os níveis de interleucina-1 foram significativamente maiores nos grupos P, M e PM em relação ao controle (figura 17). Os níveis de PDGF também foram diferentes entre os grupos ( $p=0,049$ ), contudo, a análise pós hoc não permitiu determinar a predominância da diferença como na análise

dos níveis de IL-1, embora o mesmo padrão seja sugerido pela distribuição dos dados (figura 18).



**Figura 17 . Comparação dos níveis de interleucina-1 (pg/mL).\*  $p < 0,05$ . C – grupo controle. P – grupo pneumectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumectomia + monocrotalina.**



**Figura 18. Comparação dos níveis de PDGF (pg/ml). \* p = 0,049. C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

A sobrevida foi significativamente menor nos grupos M e PM, em relação aos grupos C e P ( $p < 0,05$ ), mas não houve diferenças entre os grupos M e PM. Os óbitos nos dois grupos começaram a partir da terceira semana após injeção da monocrotalina (figura 19).

% Vivos

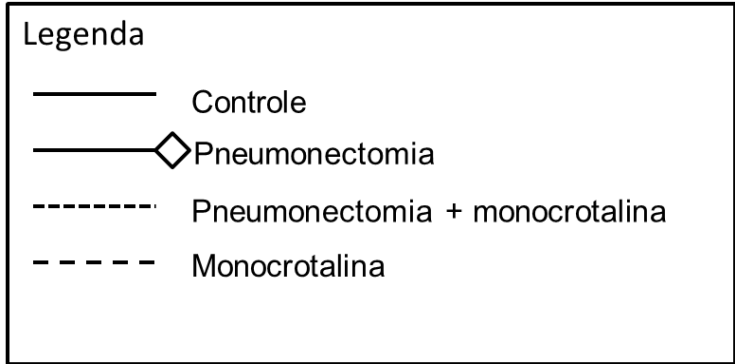
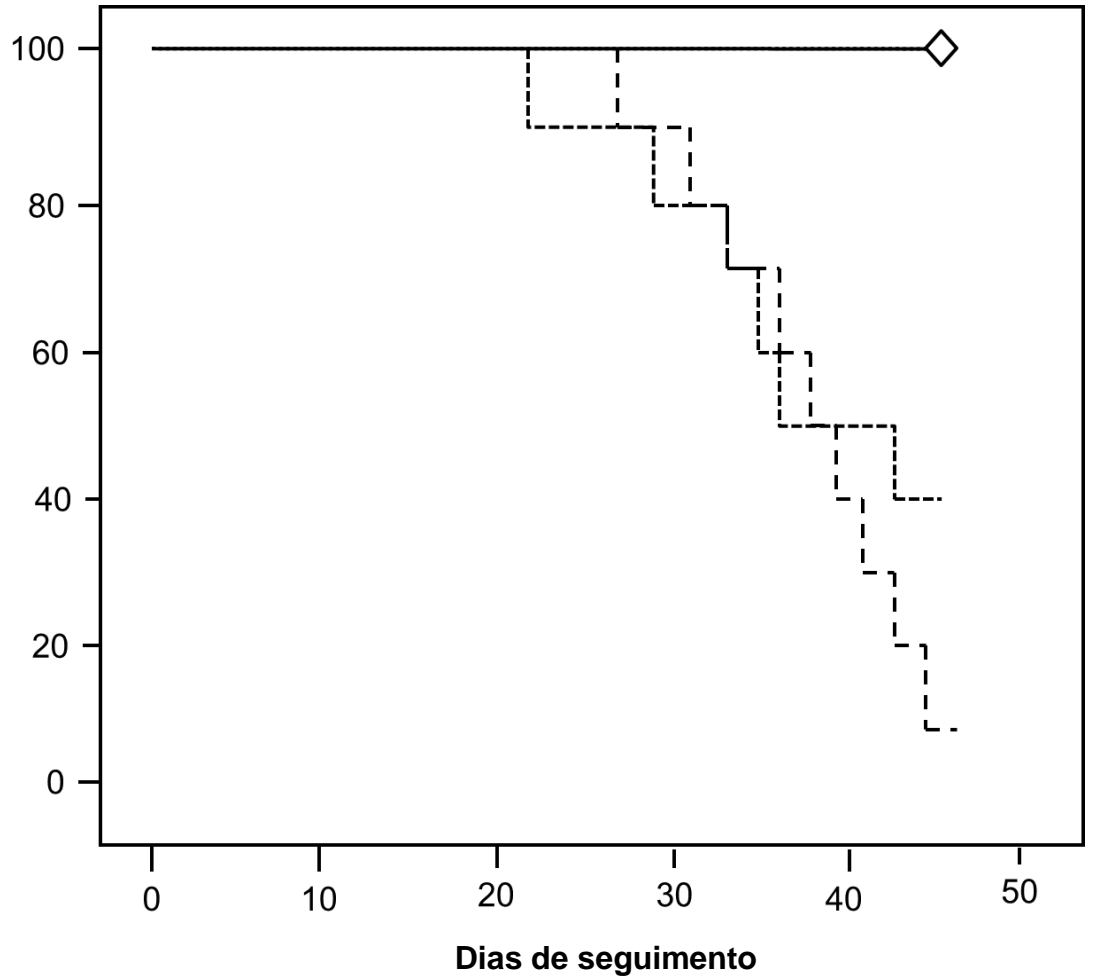


Figura 19. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier (p<0,05).

---

**DISCUSSÃO**

---

## DISCUSSÃO

---

Nosso estudo demonstrou que tanto o modelo com administração isolada de monocrotalina, quanto sua associação com hiperfluxo gerado pela pneumonectomia são geradores de hipertensão pulmonar em ratos. De forma análoga e conseqüente, foi observado aumento do índice de hipertrofia ventricular direita e do peso do ventrículo direito nos grupos com hipertensão pulmonar, em relação aos grupos controle e pneumonectomia, sendo maiores os valores encontrados no grupo de associação pneumonectomia+monocrotalina em relação ao grupo de administração isolada de monocrotalina.

O desenvolvimento dos modelos de hipertensão pulmonar representam *per se* o primeiro achado importante de nosso estudo, uma vez ser esse o primeiro estudo da Disciplina de Pneumologia da FMUSP com modelos experimentais diretamente voltados ao estudo da circulação pulmonar. Desta forma, este estudo inaugura uma linha de pesquisa a ser seguida mais especificamente pelo Grupo de Circulação Pulmonar da Disciplina de Pneumologia.

O achado de maior hipertrofia de ventrículo direito nos dois grupos com hipertensão pulmonar era esperado, dado o sucesso no desenvolvimento de hipertensão pulmonar nos modelos escolhidos. Interessante notar que a pneumonectomia isolada não representa estímulo



suficiente para a geração aguda de hipertensão pulmonar ou de hipertrofia de ventrículo direito [39].

Um potencial fator confundidor para a análise da hipertrofia do ventrículo direito seria a gênese de miocardite diretamente relacionada à administração de monocrotalina [28]. Todavia, o achado de pesos semelhantes de ventrículo esquerdo nos diferentes grupos não sugere a presença de alterações cardíacas globais em nosso estudo, diminuindo a possibilidade de existência de miocardite. Ainda assim, acreditamos que o achado de maior hipertrofia de VD no grupo PM, embora sugira maior repercussão hemodinâmica deste modelo em particular, não pode embasar, isoladamente, a superioridade do modelo de hiperfluxo pulmonar sobre o modelo de monocrotalina isolado.

Os grupos M e PM não apresentaram diferenças entre si, em relação à área da camada média, mas quando comparados ao grupo controle ambos apresentaram área significativamente maior ( $p = 0,013$ ), confirmando que os dois modelos geram alterações patológicas de hipertensão pulmonar. Os grupos C e P não apresentaram diferença significativa na área da camada média, demonstrando mais uma vez que a pneumonectomia, isoladamente, não causa remodelação vascular pulmonar, agudamente. Um dado importante é que em nenhum dos grupos houve proliferação da camada íntima, o que não confirma achados de outros autores [29,30,33]. Ainda sobre os trabalhos destes autores é importante ressaltar também que os achados de camada neoíntima não foram encontradas em todas as artérias

acinares e não ocorreram em nenhuma artéria pré-acinar [29, 30]. Mesmo nas artérias acinares, a proliferação encontrada nos estudos anteriores não era homogênea e nem atingia toda a extensão vascular [29].

Os estudos de Tanaka et al. [29] e Okada et al. [30] foram os dois trabalhos iniciais que nos motivaram a comparar os modelos de hiperfluxo com monocrotalina, através da pneumonectomia esquerda, com o modelo de administração isolada de monocrotalina. Tanaka et al. mostraram que a criação de um shunt sistêmico pulmonar associado a lesão por monocrotalina, foi responsável pelo aparecimento de oclusão vascular através de proliferação intimal. Okada et al., demonstraram que a pneumonectomia esquerda, aumentando o fluxo no pulmão direito, realizada uma semana após a injeção de monocrotalina, apresentou as mesmas lesões, e isto não ocorreu devido ao crescimento pulmonar compensatório, já que, no mesmo estudo, o shunt sistêmico pulmonar com monocrotalina também foi realizado e mostrou as mesmas lesões, não havendo diferenças nos dois grupos, quanto a magnitude das lesões. Quanto ao crescimento pulmonar pós- pneumonectomia sabe-se que ocorre nos ratos mais jovens, enquanto estão em crescimento. Na medida em que atingem a idade adulta, o fenômeno diminui [30].

Um dado interessante no estudo de Okada et al., é que a metodologia utilizada foi a realização da pneumonectomia esquerda uma semana após a injeção de monocrotalina. Em nosso estudo, injetamos monocrotalina uma semana após a pneumonectomia. Segundo Okada et al., a ordem da injeção

da monocrotalina – antes ou após a pneumonectomia- não influenciou nos resultados histológicos, porém como a hipertrofia ventricular direita foi semelhante nos dois tipos de intervenção, os autores acreditaram que as lesões histológicas foram parecidas, porém não mostraram os dados histológicos relacionados a intervenção de monocrotalina após a pneumonectomia, concluindo que as alterações histológicas foram semelhantes apenas por perfil hemodinâmico parecido. Tal fato impossibilita uma análise mais acurada sobre a influência do momento de administração da monocrotalina sobre o desenvolvimento ou não de proliferação de camada íntima.

No nosso estudo não observamos as lesões intimais descritas por Okada et al. Acreditamos que vários fatores podem estar relacionados à diferença nos achados entre os dois estudos. Inicialmente, um fator que pode ter contribuído foi o tempo de exposição à monocrotalina; enquanto no estudo de Okada et al. esse tempo foi de 5 semanas, em nosso estudo observamos os animais por 4 semanas após a injeção de monocrotalina. Complementarmente, e talvez também relacionado ao tempo de exposição, o nível de pressão média de artéria pulmonar no grupo monocrotalina com pneumonectomia foi significativamente maior do que no grupo monocrotalina no estudo de Okada et al.. Embora uma clara tendência seja observada em nosso estudo, a variabilidade dos valores de pressão média da artéria pulmonar encontrados no grupo monocrotalina não permitiu atingir-se significância estatística, denotando outra diferença entre os dois estudos.

Como a hipótese de Okada et al. é que as lesões intimaes ocorrem por estresse de cisalhamento endotelial, maiores níveis de pressão média de artéria pulmonar podem ter significativo papel na formação das lesões.

Porém, se analisarmos a curva de sobrevivência nos dois modelos, em nosso estudo, podemos observar que mesmo após a quinta semana de injeção de monocrotalina nos ratos pneumonectomizados - que foi o tempo total de exposição no trabalho de Okada et al. - não houve diferença significativa de sobrevivência, mostrando que mesmo que tenha existido proliferação intimal, levando a oclusão vascular, tal fato não foi suficiente para influenciar a sobrevivência do modelo.

Outro aspecto já descrito, com potencial implicação nos modelos experimentais associados a hiperfluxo, diz respeito à idade dos animais estudados. Em nosso estudo não utilizamos ratos tão jovens como os utilizados por White et al.[33]. Estes observaram lesões complexas proliferativas perivasculares nos ratos, fato não observado nos demais estudos com o mesmo modelo de associação de hiperfluxo com administração de monocrotalina [29,30]. Provavelmente, a diferença se deveu à idade mais jovem dos ratos utilizados por White et al., já que a metodologia utilizada foi a mesma. Com a idade maior dos ratos, o fenômeno do crescimento pulmonar pós pneumonectomia é minimizado, além dos efeitos inflamatórios da monocrotalina. Assim, no trabalho de White et al., os fenômenos observados podem ter sido diretamente influenciados pelo crescimento pulmonar compensatório, pós pneumonectomia [29]. A

dúvida quanto ao real papel do crescimento pulmonar pós-pneumonectomia no favorecimento do desenvolvimento de lesões endoteliais complexas só poderá ser sanada com a comparação direta do modelo de hiperfluxo associado a monocrotalina em duas populações distintas quanto à idade dos animais estudados.

Em relação aos marcadores inflamatórios, encontramos níveis significativamente elevados de IL-1 nos grupos P, M e PM em relação ao grupo controle, sendo padrão semelhante encontrado nos níveis de PDGF. Isso demonstra que a manipulação cirúrgica, isoladamente, já aumenta os níveis destes marcadores inflamatórios, limitando sua utilização na comparação dos modelos embora já se tenha demonstrado que tais marcadores encontram-se aumentados em indivíduos portadores de HAP [24,40]. Além disso, deve-se ressaltar que nosso estudo mensurou os níveis destes marcadores em amostras de pulmão total, não utilizando técnica de microdissecção para analisar material vascular isolado [22] o que faz com que qualquer fenômeno inflamatório pulmonar possa ser refletido na metodologia utilizada, caracterizando uma limitação dessa técnica utilizada.

Além disso, um aspecto de absoluta importância, quando se estuda modelos de hipertensão pulmonar em animais, é que até o momento nenhum modelo experimental mimetiza de maneira fidedigna a HAP de seres humanos. Isto acontece por uma série de motivos; talvez o mais marcante seja o tempo de instalação da hipertensão pulmonar. Enquanto em seres humanos, a doença se desenvolve ao longo de anos, nos animais

encontramos o desenvolvimento de hipertensão pulmonar a partir da terceira semana do modelo. Assim, é lógico pensar que os mecanismos fisiopatológicos implicados no desenvolvimento das lesões vasculares pulmonares sejam significativamente diferentes [28].

Em nosso estudo, pudemos observar que os dois modelos começaram a morrer após o estabelecimento da hipertensão pulmonar, depois da terceira semana de injeção da monocrotalina. Não houve diferença significativa na sobrevida entre os dois grupos que desenvolveram hipertensão pulmonar, embora a sobrevida de ambos tenha sido significativamente pior que a sobrevida dos grupos controle e pneumonectomia. Isto nos mostra que o modelo de pneumonectomia com monocrotalina, apesar de ter gerado maior hipertrofia de ventrículo direito, não acarretou curso clínico pior que o modelo de administração isolada de monocrotalina. Desta maneira, o achado de maior hipertrofia de ventrículo direito do modelo de pneumonectomia com monocrotalina, isoladamente, pode significar apenas um fenômeno de adaptação, não se explicando somente por aumento da resistência vascular pulmonar, mas também em resposta ao hiperfluxo gerado pela pneumonectomia. Se por um lado, a gravidade do modelo de hiperfluxo não justifica superioridade em relação ao uso isolado de monocrotalina, seu uso pode estar mais indicado em situações em que o foco de atenção seja a remodelação do ventrículo direito, com intervenções diretamente desenvolvidas para esse fim.

Por fim, um aspecto inovador de nosso estudo foi o uso da sobrevida para caracterizar a real diferença de gravidade entre os modelos estudados. Acreditamos ser esse o parâmetro mais relevante a ser utilizado na tentativa de caracterizar a gravidade do modelo, principalmente se o desenvolvimento de tal modelo vise o estudo de potenciais intervenções terapêuticas para a doença em estudo e não apenas para um ou outro aspecto da mesma. Neste sentido, não se caracterizou em nosso estudo, superioridade de um modelo em relação a outro; desta forma, não se justifica ainda a substituição do modelo de administração isolada de monocrotalina pelo modelo de associação com hiperfluxo. Se essa conclusão vale para o estudo de drogas em hipertensão pulmonar, a mesma não se aplica para o estudo de drogas voltadas ao remodelamento do ventrículo direito. O achado de maior hipertrofia de VD no modelo de hiperfluxo potencialmente o torna mais sensível para esse tipo de estudo.

---

**CONCLUSÃO**

---



## CONCLUSÃO

---

O modelo de injeção de monocrotalina associada a pneumonectomia não apresenta diferenças significativas em relação ao modelo de injeção isolada de monocrotalina quanto à medida hemodinâmica invasiva, aos marcadores inflamatórios e à sobrevida, apresentando apenas maior hipertrofia de ventrículo direito. Assim não se caracteriza superioridade que justifique a substituição do modelo clássico com administração isolada de monocrotalina.

---

## **REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

---

1. Souza R, Cardoso AP, Pedra CA, Jardim C, Watge D, Campos FT, et al. Diretrizes Brasileiras para manejo da Hipertensão Pulmonar. *J Bras Pneumol* 2005; 31(2): 1-31.
2. Archer S, Rich S. Primary Pulmonary Hypertension – A vascular biology and translational research “Work in Progress”. *Circulation* 2000; 102: 2781- 91.
3. Hoette S, Jardim C, Souza R. Diagnóstico e tratamento da hipertensão pulmonar: uma atualização. *J Bras Pneumol* 2010; 36(6): 795-811.
4. Humbert M, Khaltaev N, Bousquet J, Souza R. Pulmonary hypertension: from an orphan disease to a public health problem. *Chest* 2007; 132(2): 365-7.
5. Fernandes CJ, Dias BA, Jardim CV, Hovnanian A, Hoette S, Morinaga LK, et al. The role of target therapies in schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2011 Oct 26 [Epub ahead of print].
6. dos Santos Fernandes CJ, Jardim CV, Hovnanian A, Hoette S, Dias BA, Souza S, et al. Survival in schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56(9): 715-20.
7. Souza R, Fernandes CJ, Jardim CV. Other causes of PAH (schistosomiasis, porto-pulmonary hypertension and hemolysis-

- associated pulmonary hypertension). *Semin Respir Crit Care Med* 2009; 30(4): 448-57.
8. Lapa M, Dias B, Jardim C, Fernandes CJ, Dourado PM, Figueiredo M, et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. *Circulation* 2009; 119(11): 1518-23.
  9. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, et al. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54(1 Suppl):S55-66.
  10. MacLaughlin V, McGoon MD. Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2006; 114: 1417- 31.
  11. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 2010; 122(2): 156-63.
  12. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, et al. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169(1): 39-45.
  13. 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(6): 967-73.
  14. Hill NS, Warbutron RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary

- hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997; 83(4): 1209-15.
15. Yuki H, Sato S, Arisaka Y, Kato S, Tomoike H. Orally administered beraprost sodium inhibits pulmonary hypertension induced by monocrotaline in rats. *Tohoku J Exp Med* 1994; 173(4): 371-5.
  16. 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 arterial hypertension in rats. *J Pharmacol Sci* 2009; 111(3): 235-43.
  17. Mouchaers KT, Schlij I, de Boer MA, Postmus PE, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP, et al. Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *Eur Respir J* 2010; 36(4): 800-7.
  18. Honório Júnior JE, Soares PM, Melo CL, Arruda Filho AC, Sena Filho JG, Barbosa Filho JM, et al. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. *Rev Bras Farmacogn* 2010; 20(3): 453-8.
  19. Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax*. 1967;22(2):176-9.
  20. Lame MW, Jones AD, Wilson DW, Dunston SK, Segall HJ. Protein targets of monocrotaline pyrrole in pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275(37):29091-9.
  21. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 1989;38(1):57-80.

22. Perros F, Dortmüller P, Souza R, Durand – Gasselín I, Godot V, Capel F, et al. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007; 29: 1-7.
23. Price LC, Montani D, Tcherakian C, Dorf Müller P, Souza R, Gambaryan N, et al. Dexamethasone reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur Respir J* 2010; 37(4): 813-22.
24. Perros F, Montani D, Dorf Müller P, Durand-Gasselín I, Tcherakian C, Pavec JL, et al. Platelet-derived growth factor expression and function in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 81-88.
25. Faul JL, Nishimura T, Berry GJ, Benson GV, Pearl RG, Kao PN. Triptolide attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162 : 2252 – 58.
26. Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, et al. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 1403-8.
27. Okada K, Bernstein ML, Zhang W, Schuster DP, Botney MD. Angiotensin-converting enzyme inhibition delays pulmonary vascular neointimal formation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 939-50.
28. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological

- discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(6):L1013-32.
29. Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD. The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J Clin Invest* 1996;98(2):434-42.
30. Okada K, Tanaka Y, Bernstein M, Zhang W, Patterson GA, Botney MD. Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1997;151(4):1019-25.
31. Rudolph AM, Neuhauser EB, Golinko RJ, Auld PA. Effects of pneumonectomy on pulmonary circulation in adult and young animals. *Circ Res* 1961;9:856-61.
32. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2003; 22: 358–63.
33. White RJ, Meoli DF, Swarthout RF, Kallop DY, Harvey II, Miller CM, et al. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: 583–90.
34. Guide for the care and use of laboratory animals. 8<sup>th</sup> ed. Washington, D.C. National Research Council of the National Academies. The National Academies Press 2011.
35. Stinger RB, Iacopino VJ, Alter I, Fitzpatrick TM, Rose JC, Kot PA. Catheterization of the pulmonary artery in the closed-chest rat. *J Appl Physiol* 1981;51(4):1047-50.

36. Chibante AMS, Vaz MAC, Vargas FS. IL-6 anti-inflammatory activity in pleural effusion post-coronary bypass graft surgery. *Rev Port Pneumol* 2007; 13(3): 319-34.
37. Acencio MMP, Vargas FS, Marchi E, Carnevale GG, Teixeira LR, Antonangelo L, et al.. Pleural mesotelial cells mediate inflammatory and profibrotic responses in talc induced pleurodesis. *Lung* 2007; 185: 343-48.
38. Antonangelo L, Vargas FS, Teixeira LR, Acencio MMP, Vaz MAC, Terra Filho M, et al. Pleurodesis induced by talc or silver nitrate: Evaluation of collagen and elastic fibers in pleural remodeling. *Lung* 2006; 184: 105-11.
39. Deslauriers J, Ugalde P, Miro S, Deslauriers DR, Ferland S, Bergeron S, et al. Long-term physiological consequences of pneumonectomy. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 23(3): 196-202.
40. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, et al. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(5): 1628-31.



## APÊNDICE

### Tabelas:

PAM	Max	Min	Mediana	25%	75%
C	24	18	20	19,75	22,25
P	25	17	21	18,5	21,5
M	57	23	30	25,25	44,75
PM	43	33	40	37	42

**Tabela 1. Pressão Média da Artéria Pulmonar (PAPm-mmHg). C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

VD (g)	Max	Min	Mediana	25%	75%
C	0,25	0,04	0,095	0,08	0,12
P	0,15	0,08	0,13	0,12	0,14
M	0,36	0,17	0,245	0,22	0,28
PM	0,47	0,21	0,37	0,302	0,403

**Tabela 2. Peso do Ventrículo Direito (VD-g). C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

VE+ S (g)	Max	Min	Mediana	25%	75%
C	0,77	0,37	0,53	0,45	0,58
P	0,72	0,34	0,54	0,47	0,58
M	0,8	0,42	0,55	0,51	0,69
PM	0,73	0,46	0,55	0,47	0,65

**Tabela 3. Peso do Ventrículo Esquerdo + Septo (VE + S-g). C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

VD/VE+S	Max	Min	Mediana	25%	75%
C	0,43	0,11	0,19	0,13	0,24
P	0,33	0,17	0,24	0,21	0,24
M	0,63	0,26	0,43	0,35	0,48
PM	1	0,4	0,56	0,49	0,79

**Tabela 4. Relação do peso do Ventrículo Direito sobre o peso do Ventrículo Esquerdo + Septo. C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

CM	Max	Min	Mediana	25%	75%
C	760,6	182,44	319,62	254,76	471,15
P	897,1	294,01	382,86	349,09	641,81
M	788,71	307	555,62	414,18	628,89
PM	2197,95	402,34	552,56	487,29	613,05

**Tabela 5. Área da Camada Média (CM- $\mu^2$ ). C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

IL-1	Max	Min	Mediana	25%	75%
C	368,8	35,6	216,1	134,7	316,3
P	3016,3	234,7	368,8	317,1	627,7
M	927,14	276,2	429,2	349,4	510,92
PM	581,2	291,2	433,75	355,1	534,27

**Tabela 6. Níveis de Interleucina 1 (pg/mL). C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

PDGF	Max	Min	Mediana	25%	75%
C	330,89	18,4	54,44	45,21	171,21
P	582,4	70,06	236,01	203,3	452,8
M	661,32	32	236	107,38	386,94
PM	691,19	93,1	355,25	136,19	517,6

**Tabela 7. Níveis de PDGF (pg/mL). C – grupo controle. P – grupo pneumonectomia. M – grupo monocrotalina. PM – grupo pneumonectomia + monocrotalina.**

