

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

*OZÉLIA SOUSA SANTOS*

**Efeitos do tempo sobre as alterações hemodinâmicas  
associadas à embolia pulmonar aguda em carneiros**

Ribeirão Preto - SP  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

OZELIA SOUSA SANTOS

**Efeitos do tempol sobre alterações hemodinâmicas  
associadas à embolia pulmonar aguda em carneiros**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo  
Tanus dos Santos

Ribeirão Preto – SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### **Ficha Catalográfica**

Sousa-Santos, Ozélia

Efeitos do tempo sobre alterações hemodinâmicas associadas à embolia pulmonar aguda em carneiros / Ozélia Sousa Santos; orientador José Eduardo Tanus dos Santos.

-Ribeirão Preto, 2010.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia Cardiovascular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Palavras-Chave: embolia pulmonar aguda; estresse oxidativo; ventrículo direito; antioxidantes, metaloproteinases da matriz; troponina I cardíaca

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Ozelia Sousa Santos

**Efeitos do tempol sobre alterações hemodinâmicas associadas à embolia pulmonar aguda em carneiros.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

**Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos**

*Instituição: FMRP-USP*

*Assinatura:* \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.**

*Instituição:*

*Assinatura:* \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.**

*Instituição:*

*Assinatura:* \_\_\_\_\_

## *Dedicatória*

---

*“Se um dia, já mulher feita e respeitada, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras se desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à infância e balbucia as últimas palavras que sempre te restarão na alma: MEU PAI, MINHA MÃE”, a quem dedico este trabalho.*

## Agradecimentos

---

Sabidamente, já dizia o rei Salomão: “O princípio da sabedoria estar em servir a Deus”, não agradecê-Lo em primeiro lugar seria negar sua perceptível e minuciosa atuação em minha vida em todos esses anos de carreira acadêmica. A Deus minha gratidão e adoração.

Segundo Mozart, “para conquistarmos algo na vida não basta ter talento, não basta ter força, é preciso também viver um grande amor”. Tenho vivido este grande amor ao lado do meu super esposo, Sandro (amorin). A você, querido, meu infinito amor, carinho e gratidão, por participar de maneira ativa, emocional e moral em todas as minhas conquistas. Te amo!

Aos meus alicerces: Batista (painho), Mercedes (mãezinha linda), Odicicléia (maninha e amiga), Ozéias (maninho e amigo), Thaiz e Sílvio (cunhados) e Hillary (fofura da titia). Eu diria que se podem ter milhões de amigos, milhões de fases, milhões de qualidades, milhões de defeitos, mas no fim, quem vai estar do seu lado em todas as suas atitudes, não importa o seu jeito ou o que você faça, que vai te aceitar do jeito que você é, é a sua **FAMÍLIA**. Eu aprendi que o melhor brinquedo é a sua família. Brinquedos vivos, que dão e recebem, que nos fazem crescer e crescem também pelas nossas mãos. Que se transformam depois em grandes amigos para toda a vida, em companhia sempre presente de qualquer maneira. Em algo que fica quando se perde tudo aquilo a que nos conduziu a nossa loucura, quando se perde o que o tempo nos vai levando. Posso dizer que sou uma pessoa de grande privilégio, pois tenho a melhor família que alguém poderia ter. Tenho as pessoas mais loucas, mais retardadas, mais felizes, mais unidas, mais amadas. Tenho vocês...

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, por acreditar em minha capacidade quando nem eu acreditava e por me ensinar que as “raízes do estudo são amargas, mas seus frutos são doces” (Aristóteles). Obrigada professor, sua participação foi fundamental nesta conquista.

Ao Prof. Dr. Paulo R. Évora que gentilmente concedeu seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos membros julgadores dessa dissertação, Prof. Dr. José Antônio Baddini Martinez e a Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Rieken Macedo Rocco pelas bem vindas sugestões ao meu trabalho e à nossa linha de pesquisa.

Aos amigos Karina Coutinho, Ellen Rizzi e Carla Ceron que contribuíram com importantes colaborações para este trabalho, além claro, de suas amizades. E aos demais amigos do Laboratório: Joice Muniz, Flávia, Vanessa Belo, Ana Carol, Ana Laura, Vanessa Fontana, Pâmela, Ricardo, Ingrid, Tatiane, Marcelo Luizon, Caroline Demag, Vânia, Valéria, Juliana, Jefferson, Stephany, Lorena, Dani, Diogo, Alisson.

Um destaque especial aos amigos Evandro Neto, peça fundamental no meu desenvolvimento intelectual e técnico nesses anos, e ao Marcelo Montenegro, meu carinho mais que especial por ter participado da construção dos meus conceitos preliminares sobre a ciência. Saibam vocês que celebrar a vida é somar amigos, experiências e conquistas, dando-lhes sempre algum significado. No meu processo de formação científica vocês não tiveram ‘algum significado’, vocês foram “**estatisticamente significativos**”. (rs)

Aos secretários Soninha, Fátima e Ramon pelas orientações, paciência e ajuda desde meu primeiro contato com esta universidade.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro durante o mestrado.

*Quanto tempo andamos com os olhos pegados ao chão, tropeçando em medos,  
descrenças, desesperanças e vazios espirituais...*

*Quanto tempo para erguer os olhos e, num gesto de criança, apontar para o céu,  
como se buscássemos na imensidão uma Saudade perdida, feito ponte a nos  
ligar ao Deus que preenche com sua presença todo o infinito!*

*Quanto tempo para compreender que somos como sementes caídas das mãos  
do Divino Semeador. Cada ser, ao seu tempo, germina rompendo suas  
entranhas e cascas cósmicas. No húmus cálido, fecundo e sofrido do chão terra,  
buscamos nutrientes e aconchego, mas é no Chão-Deus-Vida que definitivamente  
florescemos e damos frutos no tempo oportuno.*

*Quanto tempo flutuamos à superfície da vida, cegos, sem rumo, obsessivos e  
estressados em caças de vento...*

*Quanto tempo para nos curar de nossa cegueira e perceber quão maravilhoso é  
o existir de cada coisa...*

*Quanto tempo semeando sonhos aos ventos, colhendo palhas em vez de grãos,  
lançando a sorte sem nada reter, procurando saídas em descaminhos...*

*Quanto tempo para caminhar com nossos próprios pés, pronunciar nossas  
próprias palavras, assumir as consequências dos nossos próprios atos, dizer sim  
quando a vida exigir sim e não quando a vida exigir não...*

*Quanto tempo para ir da agitação ao silêncio interior e escutar a Respiração de  
Deus.*

*Quanto tempo para dizer com simplicidade: "Pai, estou aqui".*

*(J. Alves)*

# *Resumo*

---

## **Efeitos do tempol sobre alterações hemodinâmicas associadas à embolia pulmonar aguda em carneiros**

Embolia pulmonar aguda (EPA) é uma importante causa de morbidade e mortalidade a nível mundial. Há evidências que o estresse oxidativo está aumentado em condições de hipertensão arterial pulmonar, inclusive durante a EPA. Contudo, a importância do aumento do estresse oxidativo nas alterações hemodinâmicas após a EPA não está bem elucidada. O tempol é conhecido como um sequestrador de radicais livres e mimético da superóxido dismutase. Neste estudo nós examinamos se o tempol atenua as mudanças hemodinâmicas associadas à EPA. Os animais do grupo Sham (n=4) receberam apenas infusão de salina, no grupo EPA (n=8) receberam infusão de salina como pré-tratamento seguido de infusão de coágulos autólogos, os animais do grupo tempol+EPA (n=7) receberam pré-tratamento com tempol (1 mg/Kg/min) seguido de indução da EPA, no grupo EPA+tempol (n=8) receberam infusão de coágulo seguido de tratamento com tempol. Foram realizadas medidas da atividade das MMPs em amostras de ventrículo direito. A determinação de espécies reativas de oxigênio no ventrículo direito foi avaliada pelo método de DHE e a liberação de Tnlc por imunensaio enzimático. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no grupo Sham. A indução da EPA aumentou a pressão média da artéria pulmonar (de  $15 \pm 2$  para  $37 \pm 6$  mmHg), o índice de resistência vascular pulmonar (de  $211 \pm 71$  para  $558 \pm 153$  dina.s.cm<sup>-5</sup>.m<sup>-2</sup>) e a dP/dt máx. (de

605 ± 112 para 1143 ± 309 mmHg/s) no grupo EPA (todos P <0,05). A infusão do tempol trinta minutos antes da indução da EPA atenuou a pressão média da artéria pulmonar para 26 ± 2 mmHg e a dP/dt máx. para 737 ± 53 mmHg/s, (todos P <0,05). Quando infundido trinta minutos após a indução da EPA, tempol produziu atenuação similar da hipertensão pulmonar induzida pela EPA. A atividade gelatinolítica das MMPs foi aumentada no grupo EPA. O pré-tratamento e tratamento com tempol atenuou os aumentos tanto na atividade das MMPs, bem como o aumento nas concentrações de espécies reativas de oxigênio no ventrículo direito (ambos P < 0,05). A EPA aumentou a concentração sérica de troponina I cardíaca, enquanto tais aumentos não foram achados nos animais pré-tratados ou tratados com tempol. Estes resultados sugerem que o uso de tempol antes e após a embolia pulmonar aguda protege o miocárdio possivelmente por reduzir o estresse oxidativo e reduzir a degradação de proteínas contráteis no coração pelas MMPs, portanto resultando em efeitos hemodinâmicos benéficos.

*Palavras chaves:* embolia pulmonar aguda; estresse oxidativo; ventrículo direito; antioxidantes, metaloproteinases da matriz; troponina I cardíaca.

# *Abstract*

---

## **Effects of tempol on hemodynamic changes associated with acute pulmonary embolism in sheep**

Acute pulmonary embolism (APE) is an important cause of morbidity and mortality worldwide. There is evidence that oxidative stress is increased in conditions of pulmonary arterial hypertension, even during the APE. However, the importance of increased oxidative stress to the hemodynamic derangements after APE are not well understood. Tempol is known as a scavenger of free radicals and a superoxide dismutase mimetic. In this study we examined whether tempol attenuates the hemodynamic changes associated with the APE. The animals in the Sham group (n=4) received only saline infusion, in the APE group (n=8) received intravenous saline as a pretreatment followed by infusion of autologous blood clots, the animals of tempol + APE group (n=7) received pretreatment with tempol (1 mg / kg / min) followed by induction of the APE, the APE + tempol group (n=8) received infusion of clot followed by treatment with tempol. The activity of MMPs was measured in samples of the right ventricle. The determination of reactive oxygen species in the right ventricle was evaluated by the DHE and the release of TnIc by enzyme immunoassay. No significant difference was found in the Sham group. The induction of APE increased pulmonary artery mean pressure ( $15 \pm 2$  to  $37 \pm 6$  mmHg), pulmonary vascular resistance index (from  $211 \pm 71$  to  $558 \pm 153$  dina.s.cm<sup>-5</sup>.m<sup>-2</sup>) and dP / dt max. ( $605 \pm 112$  to  $1143 \pm 309$  mmHg / s) in the APE group (all P <0.05).

The infusion of tempol thirty minutes before induction of APE attenuated the pulmonary artery mean pressure to  $26 \pm 2$  mmHg and  $dP / dt$  max. to  $737 \pm 53$  mmHg / s (all  $P < 0.05$ ). When infused thirty minutes after the induction of the APE, tempol produced similar attenuation of APE-induced pulmonary hypertension. The gelatinolytic activity of MMPs was increased in the APE group. Pretreatment and treatment with tempol attenuated the increases in both the activity of MMPs, as well as the increases in reactive oxygen species concentrations in the right ventricle (both  $P < 0.05$ ). APE increased the concentrations of serum cardiac troponin I, whereas no such increases were found in animals pretreated or treated with tempol. These results suggest that the use of tempol before and after acute pulmonary embolism protects the myocardium possibly by reducing oxidative stress and by reducing the degradation of contractile proteins in heart MMPs, thus resulting in beneficial hemodynamic effects.

*Keywords:* acute pulmonary embolism, oxidative stress, right ventricle; antioxidants, matrix metalloproteinases; cardiac troponin I.

## Lista de ilustrações

### Figuras:

---

<b>Figura 1:</b> Ilustração esquemática do preparo e monitoração do animal	38
<b>Figura 2:</b> Ilustração do cateter de Swan-Ganz 7,5-F	39
<b>Figura 3:</b> Evolução do cateter de Swan-Ganz	41
<b>Figura 4:</b> Ilustração esquemática da curva de termodiluição	43
<b>Figura 5:</b> Desenho esquemático do protocolo experimental	44
<b>Figura 6:</b> Efeito do tempol sobre a pressão média da artéria pulmonar (PMAP)	55
<b>Figura 7:</b> Efeito do tempol sobre o índice de resistência vascular pulmonar (IRVP)	56
<b>Figura 8:</b> Efeito do tempol sobre a pressão arterial média (PAM)	57
<b>Figura 9:</b> Efeito do tempol sobre o índice de resistência vascular sistêmico (IRVS)	58
<b>Figura 10:</b> Efeito do tempol sobre a frequência cardíaca (FC)	59
<b>Figura 11:</b> Efeito do tempol sobre o índice cardíaco (IC)	60
<b>Figura 12:</b> Efeito do tempol sobre a dP/dt máxima	61
<b>Figura 13:</b> Gel de zimografia do ventrículo direito	62
<b>Figura 14:</b> Quantificação de MMP-2 e -9 pelo método da zimografia	62
<b>Figura 15:</b> Avaliação da atividade das MMP-2 e -9 utilizando um kit de atividade gelatinolítica	63
<b>Figura 16:</b> Fotografia de cortes de ventrículo	65
<b>Figura 17:</b> Avaliação da atividade das MMP-2 e -9 pelo método da zimografia <i>in situ</i> .	65
<b>Figura 18:</b> Avaliação da concentração de troponina I cardíaca no soro	66
<b>Figura 19:</b> Fotografia de cortes de ventrículo direito	68

<b>Figura 20: Avaliação dos níveis de EROs</b>	<b>68</b>
--	-----------

***Tabelas:***

---

<b>Tabela 1 - Valor da Pressão média da artéria pulmonar (PMAP)</b>	<b>88</b>
<b>Tabela 2 - Valor do Índice de Resistência Vascular Pulmonar (IRVP)</b>	<b>88</b>
<b>Tabela 3 - Valor da pressão arterial média em (PAM)</b>	<b>89</b>
<b>Tabela 4 - Valor do Índice de Resistência Vascular sistêmico (IRVS)</b>	<b>89</b>
<b>Tabela 5 - Valor da frequência cardíaca (FC)</b>	<b>90</b>
<b>Tabela 6 - Valor do índice cardíaco (IC)</b>	<b>90</b>
<b>Tabela 7 - Valor da dP/dt máx.</b>	<b>91</b>

## ***Listas de abreviaturas e siglas***

---

**ANOVA:** análise de variância de uma via  
**ASC:** área de superfície corpórea  
**BH<sub>4</sub>:** tetrahidrobiopterina  
**BIG-ET:** big entotelina  
**BL:** Basal  
**BSA:** soro fetal bovino  
**CaCl<sub>2</sub>:** cloreto de cálcio  
**CETEA-FMRP:** Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
**CGRP:** peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
**COX:** cicloxigenase  
**DATASUS:** departamento de informática do Sistema Único de Saúde  
**DC:** débito cardíaco  
**DP/DT:** variação da pressão em função do tempo  
**ECG:** eletrocardiograma  
**EDTA:** ácido etilenodiamino tetracético  
**EP:** embolia pulmonar  
**EPA:** embolia pulmonar aguda  
**EPM:** erro padrão da média  
**ERO:** espécie reativa de oxigênio  
**EO:** estresse oxidativo  
**FC:** frequência cardíaca  
**GSH:**  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio  
**HAP:** hipertensão arterial pulmonar  
**IC:** índice cardíaco  
**IRVP:** índice de resistência vascular pulmonar  
**IRVS:** índice de resistência vascular sistêmico  
**MCL-1:** miosina de cadeia leve 1  
**MMP:** metaloproteinases de matriz  
**MMP-1:** metaloproteinase de matriz 1  
**MMP-2:** metaloproteinase de matriz 2  
**MMP-8:** metaloproteinase de matriz 8  
**MMP-9:** metaloproteinase de matriz 9  
**NANC:** Não adrenérgico não colinérgico  
**NOS:** sintase do óxido nítrico  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** superóxido  
**OCT:** *optimal cutting temperature*  
**ONOO<sup>-</sup>:** peróxido de nitrito  
**PAM:** pressão arterial média  
**PaO<sub>2</sub>:** pressão arterial do oxigênio  
**PAP:** pressão arterial pulmonar  
**PMAP:** pressão média artéria pulmonar  
**Poap:** pressão de oclusão da artéria pulmonar

**Pró-MMP:** forma latente das metaloproteinases de matriz  
**PSAP:** pressão sistólica da artéria pulmonar  
**PSVD:** pressão sistólica do ventrículo direito  
**PVC:** pressão venosa central  
**RVP:** resistência vascular pulmonar  
**SDS/PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida com o uso de SDS  
**SDS:** dodecil sulfato de sódio  
**SOD:** superóxido dismutase  
**TIMPs:** inibidores teciduais das MMPs  
**TnIc:** troponina I cardíaca  
**VD:** ventrículo direito  
**VE:** ventrículo esquerdo  
**Zn<sup>2+</sup>:** zinco

# *Sumário*

---

<b>RESUMO</b>	VIII
<b>ABSTRACT</b>	X
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	XII
<b>TABELAS</b>	XIII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	XIV
<b>1. Introdução</b>	18
1.1 Epidemiologia da embolia pulmonar aguda	19
1.2 Fisiologia da circulação pulmonar	20
1.3 Fisiopatologia da embolia pulmonar aguda	21
1.4 Participação das metaloproteinases na embolia pulmonar aguda	24
1.5 Troponina I como possível marcador de embolia pulmonar aguda	26
1.6 Tratamento atual da embolia pulmonar aguda	27
1.7 Participação do estresse oxidativo na embolia pulmonar aguda	28
1.8 Tempol como antioxidante na circulação pulmonar	30
<b>2. Hipótese</b>	33
<b>3. Objetivos</b>	35
<b>4. Materiais e métodos</b>	36
4.1 Preparo e monitoração dos animais	37
4.2 Peculiaridades do cateter de Swan-Ganz	39
4.3 Medida do débito cardíaco	41
4.4 Cálculo dos parâmetros hemodinâmicos	43

4.5 Droga utilizada	44
4.6 Protocolo experimental	44
4.7 Parâmetros bioquímicos	47
4.7.1 Dosagem de espécies reativas de oxigênio no ventrículo direito	47
4.7.2 Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia <i>in situ</i>	47
4.7.3 Determinação dos níveis de MMP-2 e -9 por zimografia em gel	48
4.7.3.1 Dosagem de proteína pelo método de Bradford	48
4.7.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%	49
4.7.4 Determinação da atividade gelatinolítica total por fluorimetria	50
4.7.5 Dosagem da troponina I cardíaca	51
4.8 Análise Estatística	52
<b>5. Resultados</b>	<b>53</b>
5.1 Efeitos do tempol sobre os parâmetros hemodinâmicos	54
5.2 Efeitos do tempol sobre as MMP-2 e -9	62
5.3 Efeitos do tempol sobre a troponina I cardíaca (Tnlc)	66
5.4 Efeitos do tempol sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs)	67
<b>6. Discussão</b>	<b>70</b>
<b>7. Conclusão</b>	<b>79</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	<b>81</b>
<b>9. Apêndice</b>	<b>87</b>

# ***1.Introdução***

## **1.1 Epidemiologia da embolia pulmonar aguda**

A embolia pulmonar aguda (EPA), condição clínica que compromete principalmente a circulação pulmonar, possui elevados dados estatísticos que tem tornado-a objeto de estudo mundial. Existem poucos dados disponíveis sobre a incidência de tromboembolismo pulmonar em nosso país. Estudos nacionais mostram que em cerca de 3% a 5% das necropsias realizadas em hospitais universitários num período de vinte e quatro anos, verifica-se a presença de tromboembolismo, e em 68% destes casos a condição foi imputada como causa do óbito (Mesquita, Morandi Junior et al. 1999; Golin, Sprovieri et al. 2002). O número de hospitalizações por embolia pulmonar no Brasil foi de aproximadamente 6.700 casos em 2004, segundo dados do DATASUS.

Nos Estados Unidos, é a terceira causa de morte entre os americanos, com mais de 500.000 casos de tromboembolismo pulmonar a cada ano, resultando em aproximadamente 200.000 óbitos (Dismuke e Wagner 1986; Horlander, Mannino et al. 2003), sendo que somente um terço desses pacientes são diagnosticados antes da morte. A letalidade associada à embolia pulmonar não tratada é de aproximadamente 30%. O diagnóstico rápido do problema é fundamental, pois o tratamento reduz a mortalidade para 2% a 8% e melhora a qualidade de vida, reduzindo a probabilidade de ocorrência de hipertensão pulmonar tromboembólica, dentre outros agravantes (Carson, Kelley et al. 1992; Goldhaber, Visani et al. 1999; Horlander, Mannino et al. 2003).

## 1.2 Fisiologia da circulação pulmonar

A circulação pulmonar, também conhecida como pequena circulação, compreende a passagem do sangue oriundo do ventrículo direito (VD) para os pulmões pela artéria pulmonar. Esta se ramifica em artérias cada vez menores que trafegam com os brônquios em direção às zonas respiratórias. As artérias menores dividem-se em arteríolas que, por sua vez, dividem-se em capilares pulmonares, que formam densas redes em torno dos alvéolos (Elliot 1992).

Algumas peculiaridades da circulação pulmonar resultam da baixa pressão hidrostática do sistema. Estas pressões são cerca de 6 vezes menores comparadas às pressões encontradas na circulação sistêmica. Quantitativamente, temos que, em indivíduos saudáveis e ao nível do mar, a pressão sistólica na artéria pulmonar (PSAP) é de 18 a 25 mmHg e a pressão média da artéria pulmonar (PMAP) de 12 a 16 mmHg (Elliot 1992; Wood 2002). A medida do gradiente transpulmonar normal (PMAP menos a pressão do átrio esquerdo ou pressão de oclusão da artéria pulmonar – Poap) é de 9 mmHg. Correspondendo a estes valores de pressões, temos que a RVP normal é menor que  $320 \text{ dina.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$  ou 4 Unidades Wood (1 Unidade Wood =  $80 \text{ dina.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$ ) (Reeves e Rubin 1998).

Também importante, o leito vascular pulmonar pode acomodar grandes volumes sanguíneos com pequenos aumentos na sua pressão arterial, fundamentalmente devido às particularidades histológicas das artérias pulmonares e o recrutamento de capilares e arteríolas (Elliot 1992).

A nível histológico, as artérias pulmonares têm uma estrutura predominantemente elástica, o que as torna mais complacentes que as artérias sistêmicas. Em condições normais, a rede arterial pulmonar encontra-se em estado mínimo de distensão, no entanto, quando submetidas ao aumento de pressão arterial se distendam mais acentuadamente (Reeves e Rubin 1998).

A propriedade de recrutamento vascular se dá à existência de áreas pulmonares ventiladas com baixa ou nenhuma perfusão, conceituadas como áreas ou zonas pulmonares de *West* (West 1977). Hipoteticamente, a ventilação e a perfusão alveolar deveriam ser uniformes; porém, isso não ocorre, mesmo em um pulmão normal. Isto porque a diferença gravitacional é um dos fatores que interferem com a distribuição do fluxo sanguíneo. Como resultado desta alteração gravitacional-dependente, temos três diferentes zonas pulmonares: A zona 1 de West, onde os vasos permanecem virtualmente fechados durante a diástole, visto que a pressão extraluminal capilar é zero ( pressão atmosférica). A zona 2 de West, onde os capilares são ocluídos devido a diferença de pressão arterial e alveolar. A zona 3 de West, localizada a base pulmonar, onde os vasos se dilatam progressivamente (West, 1977).

### **1.3 Fisiopatologia da embolia pulmonar aguda**

O distúrbio hemodinâmico causado pela EPA é o resultado de um conjunto de fatores que tomados juntos constitui o cenário fisiopatológico da embolia pulmonar aguda. Trata-se de alterações potencialmente fatais decorrentes de trombos formados no sistema venoso profundo dos membros inferiores, membros superiores,

nas veias pélvicas e renais, além de também possuírem origem gasosa, gordurosa e amniótica (Weinmann e Salzman 1994; Riedel 2001).

Após migrarem pelos vasos sanguíneos, os êmbolos atravessam as cavidades direitas do coração e causam a obstrução das ramificações arteriais dos pulmões desencadeando um conjunto de alterações hemodinâmicas e bioquímicas. O grau destas alterações depende da extensão da obstrução da circulação pulmonar, da recorrência de episódios tromboembólicos, da quantidade e qualidade do êmbolo e do estado cardiovascular prévio do paciente (Rideal 2001).

A primeira alteração detectada é o aumento da pressão arterial pulmonar secundária à elevação da resistência arteriolar nos pulmões. Quando a pressão arterial pulmonar (PMAP) é superior a 25 mmHg em repouso ou 30 mmHg durante esforço, ou quando os valores de RVP são superiores a  $320 \text{ dina.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$ , temos um quadro caracterizado como hipertensão pulmonar (Wood 2002).

Tanto o aumento da resistência quanto da pressão arterial pulmonar são consequentes, em parte, da obstrução mecânica do trombo, visto que alguns mediadores humorais, como por exemplo, tromboxano  $A_2$ , serotonina, endotelina-1, fator ativador de plaquetas, histamina e algumas prostaglandinas, podem gerar vasospasmos em segmentos não embolizados do pulmão, ocasionando uma hipertensão pulmonar desproporcional à vasculatura obstruída mecanicamente (Rideal 2001; Wood 2002).

Outra alteração que contribui para elevar os níveis tensionais pulmonares é a hipoxemia, que surge na embolia pulmonar como consequência do aparecimento de áreas pulmonares com uma relação ventilação/perfusão (V/Q) inadequada (Stratmann e Gregory 2003). Esta relação inadequada pode se dar de duas

maneiras: Primeiro, a perfusão pode estar diminuída em relação à ventilação, como observado em regiões conhecidas como espaço morto alveolar. Nestes espaços as unidades pulmonares continuam ventiladas a despeito da diminuição ou ausência do fluxo sanguíneo, decorrentes da obstrução total ou parcial dos vasos pulmonares. Segundo, é possível que a ventilação esteja diminuída em relação ao fluxo sanguíneo, como visto em áreas com “*shunt*” pulmonar. Geralmente ocorre em regiões de colapso e infarto que não são ventiladas, mas permanecem recebendo fluxo sanguíneo (Elliot 1992; Rideal 2001).

Quando a concentração de oxigênio nos alvéolos diminui abaixo da normal – pressão arterial de oxigênio (PaO<sub>2</sub>) abaixo de 73 mmHg) – os vasos sanguíneos pulmonares adjacentes aos alvéolos sob baixas pressões de oxigênio se contraem no decorrer de 3 a 10 minutos levando ao aumento da resistência vascular periférica (Voelkel e Tuder 2000), isto reduz o fluxo sanguíneo para as áreas pobremente ventiladas do pulmão em favor da perfusão das áreas mais ventiladas, otimizando a razão ventilação/perfusão nos pulmões e, conseqüentemente, a oxigenação do sangue arterial a custo da elevação da pressão arterial pulmonar (Dantzker, Wagner et al. 1978; Hodyc, Snorek et al. 2007). Este aumento da resistência vascular pulmonar por conta da hipóxia é denominado vasoconstrição pulmonar hipóxica.

Tomados juntos, estes processos ocasionam um aumento substancial na pós-carga do ventrículo direito (VD). Inicialmente a manutenção compensatória do seu débito cardíaco é alcançada pela combinação de taquicardia dada à ação de catecolaminas e a melhora da eficiência contrátil por meio da maior distensão da miofibrila (lei de Frank-Starling), observando-se um aumento do trabalho do VD (Wood 2002). Entretanto, este trabalho não consegue ser sustentado por muito

tempo, isto porque o ventrículo direito é uma câmara de paredes finas designado para trabalhar normalmente sobre baixa pressão arterial pulmonar (12 - 16 mmHg) e resistência vascular pulmonar (valores menores que  $320 \text{ dina.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$ ). Quando a RVP é subitamente aumentada ocorre uma descompensação dessa cavidade, seguida de queda do débito cardíaco. A queda do débito reduz a pré-carga ao ventrículo esquerdo, com redução na perfusão sistêmica (Riedel 2001; Wood 2002; Bogaard et al. 2009; Watts, Marchick et al. 2010). Em condições crônicas, a hipertrofia e a dilatação ventricular são os mecanismos adaptativos que objetivam manter o débito cardíaco adequado.

Ainda nesta situação, também pode aparecer desvio do septo interventricular para a esquerda, contribuindo ainda mais para reduzir o enchimento ventricular esquerdo e o volume sistólico sistêmico. O que pode acentuar a disfunção ventricular direita, uma vez que, a hipotensão arterial na raiz da aorta pode reduzir a perfusão coronariana precipitando uma situação de isquemia do VD (Watts, Marchick et al. 2010).

#### **1.4 Participação das metaloproteinases na embolia pulmonar aguda**

As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) foram inicialmente descobertas em 1962 como enzimas responsáveis pela degradação das fibras de colágeno intersticial, fibronectina, membrana basal e vários proteoglicanos (Schulz 2007). Desde então, os estudos tem mostrado importante papel desenvolvido por estas enzimas em processos fisiológicos tais como: embriogênese (Vu e Werb 2000), angiogênese (Roy, Zhang et al. 2006) e motilidade celular (Amalinei, Caruntu et al. 2007; Schulz 2007). Assim como em processos patológicos: progressão de

tumor (Deryugina e Quigley 2006), inflamação neurológica (Leonardo e Pennypacker 2009), doenças neurodegenerativas (Rosenberg 2009), doenças cardiovasculares (Kim, Dalal et al. 2000; Baicu, Stroud et al. 2003) e embolia pulmonar aguda (Souza-Costa, Zerbini et al. 2005; Fortuna, Figueiredo-Lopes et al. 2007). Embora as MMPs sejam mais conhecidas por suas ações no remodelamento da matriz extracelular, recentes estudos tem demonstrado que em particular as MMPs -2 e -9, também desempenham importantes papéis intracelulares

Há evidências que mostram as MMPs -1, -2, e -9 sendo expressas constitutivamente nas células do músculo liso vascular e endotelial, enquanto que no coração elas estão predominantemente presentes em sua forma inativa (pró-MMPs) e são frequentemente co-expressadas em um complexo com seus inibidores endógenos (TIMPs) (Tyagi, Matsubara et al. 1993), além de serem expressadas também nos miócitos cardíacos e fibroblastos (Coker, Doscher et al. 1999; Wang, Schulze et al. 2002); já a MMP-9 é uma enzima cuja expressão é induzida por ativação imune, ou seja, em resposta a citocinas pró-inflamatórias; e está relacionada com a ativação de leucócitos e macrófagos (Heymans, Lutun et al. 1999; Schulz 2007).

As MMPs são inicialmente expressas como enzimas latentes (pró-MMPs), podendo ser ativadas por clivagem proteolítica no meio extracelular passando para uma forma enzimaticamente ativa (O'Connor e FitzGerald 1994). Dentre outras maneiras de ativação das MMPs estão as espécies reativas de oxigênio envolvidas numa via que não necessariamente envolve a remoção proteolítica do pró-peptídeo inibitório.

As espécies reativas de oxigênio podem reagir com o resíduo de cisteína, presente no pró-peptídeo das MMPs, promovendo uma ruptura do grupamento tiol com o zinco, o que resulta na sua ativação. Esse processo de modulação da atividade das MMPs por estresse oxidativo tem sido descrito para as MMPs -1, -2, -8 e -9 (Okamoto, Akaike et al. 2001).

Estudos recentes têm mostrado que as MMPs em particular as MMPs -2 e -9, estão envolvidas na hipertensão pulmonar aguda associada a EPA (Palei, Zaneti et al. 2005; Souza-Costa, Zerbini et al. 2005; Fortuna, Figueiredo-Lopes et al. 2007; Souza-Costa, Figueiredo-Lopes et al. 2007). Palei e colaboradores mostraram que a inibição da MMP-9 atenua as consequências hemodinâmicas agudas em modelo de embolia em ratos. Estes mesmos resultados foram reprodutivos quando modelo de EPA foi desenvolvido em cães (Fortuna, Figueiredo-Lopes et al. 2007). A importante participação das MMPs na EPA está de acordo com outros estudos *in vitro*, os quais mostram as MMPs modulando as concentrações de peptídeos vasoativos a exemplo da big endotelina gerando peptídeo com ação vasoconstritora mais potente (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999; Fernandez-Patron, Zouki et al. 2001), o peptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), reduzindo significativamente sua capacidade vasodilatadora (Fernandez-Patron, Stewart et al. 2000) e adrenomedulina (ADM), gerando simultaneamente um efeito vasoconstritor eliminando o peptídeo vasodilatador original (Martinez, Oh et al. 2004).

Através dessa ação proteolítica sobre alguns peptídeos vasoativos é possível que as MMPs tenham efeitos sobre o controle do tônus vascular pulmonar, podendo dessa forma contribuir para o agravamento da hipertensão pulmonar.

## **1.5 Troponina I cardíaca como possível marcador da embolia pulmonar aguda**

A troponina é um dos componentes protéicos do músculo estriado. É formada por três sub-unidades I, T e C, que intervêm conjuntamente na contração muscular. A troponina I possui uma isoforma cardíaca que permite evidenciar uma lesão do miocárdio de forma altamente específica, portanto tem sido utilizada como marcador para disfunção miocárdica (Alpert, Thygesen et al. 2000).

A troponina I cardíaca (TnIc) tem emergido como promissor biomarcador para a estratificação de pacientes com EPA, isto porque possibilita a detecção de pequenos danos celulares do miocárdio (Goldhaber 2003). Em pacientes com embolia pulmonar grave, o aumento da pressão na artéria pulmonar pode levar à disfunção progressiva do ventrículo direito, gerada pela isquemia e seguida de infarto. Estudos clínicos mostraram recentemente que a elevação da TnIc no soro de pacientes com embolia pulmonar aguda esteve associada de forma estatisticamente significativa com a disfunção do ventrículo direito detectada por ecocardiografia e eletrocardiografia, e com o índice de mortalidade durante a fase aguda da doença (Konstantinides, Geibel et al. 2002). Neste contexto os ensaios de troponina cardíaca podem ser utilizados em conjunto com parâmetros clínicos e ecocardiográficos de disfunção ventricular, para orientar o tratamento de pacientes com EPA, e sobre tudo melhorar o prognóstico de pacientes de alto risco.

## **1.6 Tratamento atual da embolia pulmonar aguda**

Partindo do conhecimento, embora não pormenorizado, da fisiopatologia da EPA é possível descrever em que consiste o tratamento geralmente utilizado em quadros de EPA. Em se tratando da obstrução mecânica como alvo farmacológico

tem-se lançado mão da embolectomia cirúrgica (retirada mecânica do trombo) (Riedel 2001; Sadosty, Boie et al. 2003); uso de agentes trombolíticos e anticoagulantes sistêmicos. Estudos recentes também tem sugerido o bloqueio farmacológico da vasoconstrição arterial pulmonar como terapia coadjuvante para o tratamento da EPA (Smulders 2001; Tanus-Santos and Moreno 2001; Dias-Junior, Montenegro et al. 2008). Entretanto, com o avanço das pesquisas, sabemos que outros fatores contribuem de forma importante para o agravamento do distúrbio hemodinâmico que se instala durante a EPA, sendo um destes o estresse oxidativo, discutido a seguir.

### **1.7 Participação do estresse oxidativo na embolia pulmonar aguda**

A definição de EROs consiste em espécies reativas derivadas do metabolismo do oxigênio que podem ser encontradas na maioria dos sistemas biológicos. São produzidas principalmente a partir da respiração mitocondrial, biossíntese do ácido aracdônico pelas enzimas lipoxigenases e ciclo-oxigenases, biossíntese do NO pelas enzimas sintase do óxido nítrico (NOS), catabolismo do  $H_2O_2$  pelas enzimas peroxidases, dentre outras vias metabólicas (Cai e Harrison 2000). Dentre várias EROs, as que apresentam maior relevância para estudos cardiovasculares são: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxil ( $OH\bullet$ ), óxido nítrico ( $NO\bullet$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), formado a partir da reação de  $O_2^-$  com o óxido nítrico (NO) (Zimmet e Hare 2006) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Cai e Harrison 2000). As concentrações fisiológicas dessas espécies reativas são reguladas por ação de enzimas antioxidantes, tais como: super óxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (Touyz e Schiffrin 2004).

No entanto, em algumas condições patológicas, pode ocorrer um desequilíbrio entre a concentração de substâncias antioxidantes e oxidantes, com predomínio destas últimas (Cai e Harrison 2000). Este processo é conhecido como estresse oxidativo, o qual leva a oxidação de macromoléculas biológicas a exemplo dos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

Há muitas evidências indicando que o estresse oxidativo está aumentado em condições de hipertensão arterial pulmonar (Brennan, Steinhorn et al. 2003; Bowers, Cool et al. 2004), inclusive durante a EPA, estudada tanto em modelos experimentais (Dikshit, Srivastava et al. 1989; Kumari, Dikshit et al. 1993; Dias-Junior, Souza-Costa et al. 2005; Souza-Silva, Dias-Junior et al. 2005; Souza-Costa, Zerbini et al. 2005), quanto em estudos clínicos (Shimizu, Nagaya et al. 2002; Muhl, Furedi et al. 2006).

Várias vias metabólicas são propostas como fonte de espécies reativas de oxigênio para a circulação pulmonar. Duas destas vias referem-se ao desacoplamento da enzima sintase do óxido nítrico (eNOS) e a NADPH oxidase, as quais tem sido sugeridas como fontes de ânion  $O_2^-$  para os pulmões, com possíveis implicações nas alterações hemodinâmicas instaladas após a EPA, visto que o  $O_2^-$  reage com NO disponível reduzindo sua biodisponibilidade e conseqüentemente seus efeitos sobre a circulação pulmonar (Li, Wallerath et al. 2002; Dias-Junior, Souza-Costa et al. 2005; Souza-Costa, Zerbini et al. 2005; Grobe, Wells et al. 2006; Liu, Zelko et al. 2006).

Logo, sabendo-se que o estresse oxidativo está elevado durante a hipertensão arterial pulmonar induzida por EPA e que as EROs podem comprometer a função vascular pulmonar por diminuir as concentrações endógenas do NO, um

seqüestrador de radicais livres, desenvolvendo propriedades antioxidantes poderia aumentar a biodisponibilidade de NO conduzindo a uma atenuação da hipertensão pulmonar.

### **1.8 Tempol como antioxidante na circulação pulmonar**

Os níveis de espécies reativas de oxigênio são determinados pelas enzimas geradoras de EROs nos compartimentos intracelulares e extracelulares, como por exemplo: NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, dentre outras (Griendling e FitzGerald 2003).

Há naturalmente mecanismos de defesas antioxidantes intra e extracelulares que seqüestram radicais livres. Um desses principais mecanismos é desenvolvido pela enzima superóxido dismutase (SOD). A SOD catalisa a conversão de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , o qual pode ser transformado em água por ação de catalases ou glutathione peroxidase. Embora a SOD seja o primeiro mecanismo de defesa fisiológico contra o estresse oxidativo, a reação do  $O_2^-$  com o NO ocorre de maneira muito mais rápida do que com a superóxido dismutase (Beckman e Koppenol 1996).

Os primeiros estudos de síntese e ação do tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil) foram descritos pelos cientistas russos Rozantsev, Swartz e colaboradores na década de 1970. Em 1990 Schnackenberg, Welch e Wilcox registraram os primeiros estudos com administração intravenosa e intraperitoneal do tempol em modelos de ratos hipertensos, o que levou a redução da pressão sanguínea e peroxidação lipídica (para revisão ver Wilcox e Pearlman 2008). Estes estudos foram seguidos por vários outros, e juntos lançaram as bases para um

crescente interesse científico nos nitróxidos como agentes para reduzir as espécies reativas de oxigênio.

Trata-se de um composto externamente estável e permeável à membrana o que permite com que exerça efeitos antioxidantes tanto no meio extracelular como intracelular. Tem sido amplamente citado como mimético da enzima superóxido dismutase (SOD), provavelmente porque esse mecanismo foi o primeiro descrito a nível molecular (Krishna, Grahame et al. 1992). Contudo, outros mecanismos estão inclusos nos seus efeitos antioxidantes, uma vez que o tempol reage com uma diversidade de oxidantes e redutantes biológicos, dentre os quais radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ), peroxil ( $\text{RO}_2^\cdot$ ), dinitrogênio ( $\text{NO}_2^\cdot$ ), til ( $\text{RS}^\cdot$ ), dentre outros (Simonsen, Christensen et al. 2009).

Elmedal e colaboradores demonstraram em modelo de hipóxia crônica em ratos que o tempol previne o desenvolvimento de hipertensão pulmonar, diminui a pressão sistólica e a hipertrofia do ventrículo direito, assim como melhora as propriedades funcional e estrutural das pequenas artérias pulmonares (Elmedal, de Dam et al. 2004). Estes achados corroboram o resultado recentemente encontrado por Hodyc e colaboradores, no qual o tempol inibe completamente a resposta vasoconstritora à hipóxia ventilatória aguda em pulmão de ratos (Hodyc, Snorek et al. 2007). Em ratos geneticamente modificados (Ren2) com super expressão de angiotensina II intrapulmonar, o tratamento com tempol atenuou substancialmente o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, provavelmente por reduzir o estresse oxidativo induzido pela NADPH oxidase (DeMarco, Habibi et al. 2008).



## ***2. Hipótese***

---

Levando-se em consideração que o estresse oxidativo participa da fisiopatologia da EPA e que há ativação de MMPs em ventrículo direito com liberação de troponina I nesta condição, a hipótese a ser testada neste estudo é a de que o tratamento com tempol possa produzir efeitos antioxidantes e atenuar as alterações hemodinâmicas associadas à embolia pulmonar. Além disto, também acreditamos que o tempol possa atenuar a ativação de MMPs no ventrículo direito, possivelmente atenuando o aumento das concentrações circulantes de troponina I cardíaca.

## ***3. Objetivo***

**3.1.** Avaliar os efeitos do tempol sobre as alterações hemodinâmicas observadas durante a embolia pulmonar aguda em carneiros.

**3.2.** Avaliar se o tratamento como tempol atenua o aumento de atividade de MMPs no ventrículo direito de carneiros submetidos à EPA, atenuando também os aumentos das concentrações circulantes de troponina I cardíaca.

## **4. Materiais e métodos**

#### 4.1. Preparo e monitoração dos animais

Os protocolos e procedimentos cirúrgicos empregados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CETEA-FMRP).

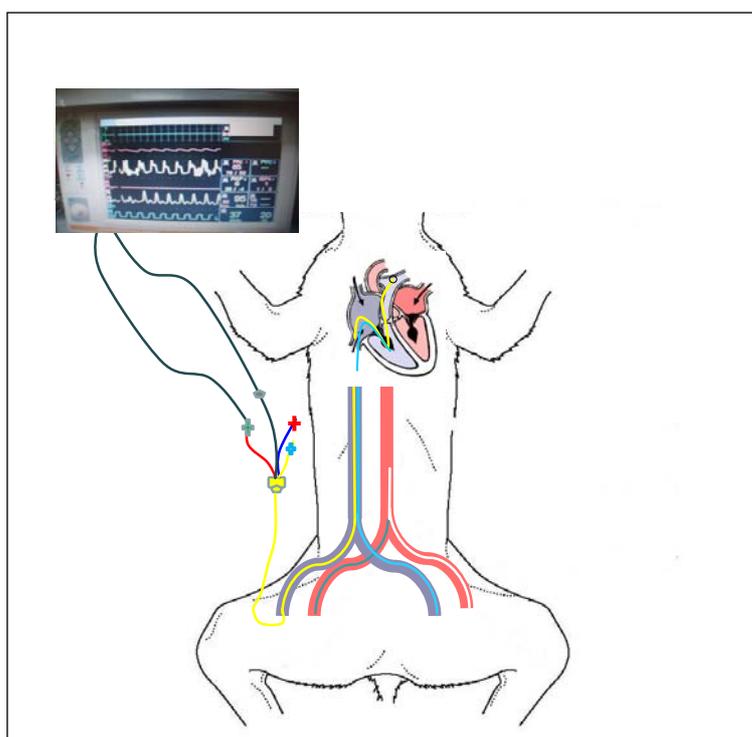
Vinte e sete carneiros da raça Santa Inês (peso médio  $\pm$  desvio padrão =  $18 \pm 2,0$ kg) obtidos de criador particular, foram anestesiados com Xilazina (0,1mg/kg) e Ketamina (15mg/kg) por via intra-muscular e a manutenção da anestesia foi feita com injeções IM repetidas a cada hora de Ketamina (7,0mg/kg) e Midazolam (2,0mg/kg). Os animais também receberam pancurônio (0,10mg/kg; dose única intravenosa), com o objetivo de impedir que o animal tente “competir” com o ventilador mecânico, uma vez que, após a indução da embolia pulmonar aguda, o animal tende a entrar em hipóxia, o que estimula o centro respiratório bem como os movimentos respiratórios, favorecendo esta competição.

Após entubação traqueal, os animais foram ventilados mecanicamente com um ventilador (Ventilador EFRA ROAD C.F., Palmer SWZ Ltda, London, UK), utilizando-se ar ambiente e volume corrente de 15 ml/kg. A frequência respiratória foi ajustada de modo a se obter níveis fisiológicos de  $ETCO_2$  (30 a 40 mmHg).

Para monitoramento hemodinâmica, foi inicialmente introduzido um cateter em uma das artérias femorais, cuja extremidade foi posicionada na artéria aorta, visando-se obter medida direta da pressão arterial sistêmica média (PAM). Uma das veias femorais foi isolada e introduzido um cateter de Swan-Ganz 7,5-F (Edwards Lifesciences, USA), cuja extremidade distal foi posicionada num dos ramos da artéria pulmonar, objetivando-se medir os seguintes parâmetros hemodinâmicos:

pressão média da artéria pulmonar (PMAP), pressão de oclusão da artéria pulmonar (Poap). O débito cardíaco (DC) foi avaliado em triplicata pelo método da termodiluição, injetando-se 3ml de solução salina resfriada à 0° Centígrados. A veia femoral contra-lateral foi canulada para introdução do cateter, cuja extremidade foi posicionado no interior da câmara do ventrículo direito, com a finalidade de mensurar a velocidade máxima de elevação da pressão ventricular direita durante a sístole ( $dP/dt$  máx. mmHg). Num segundo momento este cateter também foi utilizado para injeção dos trombos para indução da EPA. O lúmen proximal deste cateter posicionado na veia cava inferior foi utilizado para medir a pressão venosa central (PVC). A frequência cardíaca (FC), saturação de oxigênio ( $SpO_2$ ) e quantidade de gás exalado ( $ETCO_2$ ) foi avaliada por oximetria de pulso. Todos os cateteres de pressão foram acoplados aos transdutores de pressão do monitor hemodinâmico (Dixtal modelo DX2010, Dixtal do Brasil, Manaus, Brasil).

A figura 1 apresenta de maneira esquemática o texto descrito acima.



**Figura 1: Ilustração esquemática do preparo e monitoração do animal.**

#### 4.2. Peculiaridades do cateter de Swan-Ganz e seu posicionamento adequado

O cateter de Swan-Ganz 7,5-F (figura 2) possui três lumens e um termistor incorporado, que se destina à medida do débito cardíaco por termodiluição. Por meio da extremidade distal é possível medir a pressão arterial pulmonar (lúmen distal) e a pressão de oclusão da artéria pulmonar (lúmen distal com o balão insuflado).

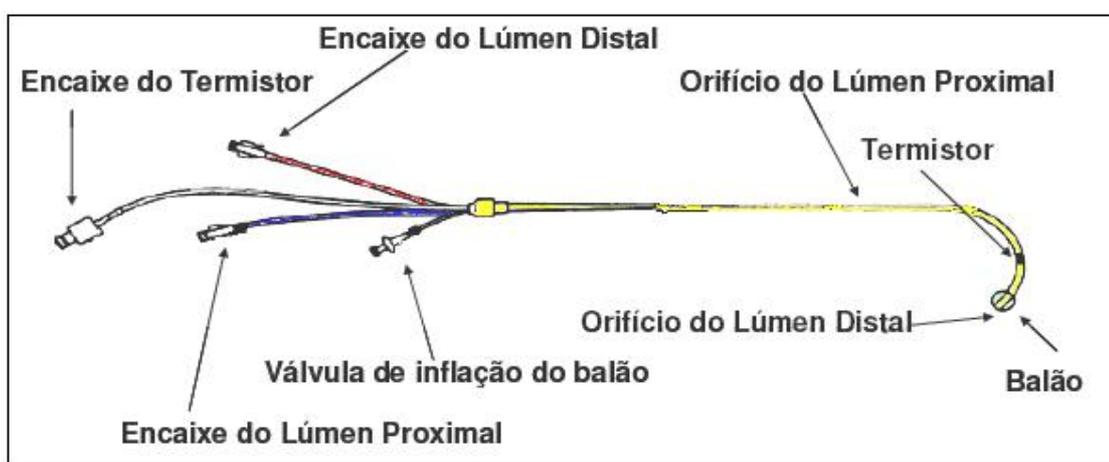


Figura 2: Ilustração do cateter de Swan-Ganz 7,5-F.

O cateter de Swan-Ganz 7,5-F foi introduzido pela veia femoral direita seguindo pela veia cava inferior, átrio direito, ventrículo direito até atingir a artéria pulmonar. A sua localização pelos vasos sanguíneos ou câmaras cardíacas por onde passou foi dada por registros de curvas de pressão características de cada um destes vasos ou câmaras. Assim, o cateter de Swan-Ganz 7,5-F atingiu o átrio direito, prosseguiu até o ventrículo direito, registrando as curvas de pressão típicas

destas câmaras ao longo do ciclo cardíaco, que foram confirmadas insuflando-se o balão na extremidade do cateter (figura 3 A e 3 B).

Progrediu-se à circulação pulmonar, onde ocorre uma mudança no padrão de registro de curva, pois a pressão sistólica normal na artéria pulmonar pode variar de 15 a 20 mmHg, sendo esta a mesma pressão sistólica do ventrículo direito. Entretanto, a pressão diastólica ventricular direita é em torno de 0 a 2 mmHg enquanto que a da artéria pulmonar pode variar de 5 a 12 mmHg (ilustrado na figura 3 C). Estes registros de pressão constituem a primeira confirmação da canulação da artéria pulmonar.

A segunda confirmação desta canulação foi dada pela oclusão de um dos ramos da artéria pulmonar que mostrou um traçado de pressão semelhante ao da PVC, porém com identificação das ondas típicas das pressões retrógradas dos capilares pulmonares (Poap), apresentando valores discretamente maiores (8 a 10 mmHg – ilustrado na figura 3 D) em comparação aos valores típicos da PVC (entre 2 e 5 mmHg). A Poap é uma medida indireta da pressão atrial esquerda, sendo assim, um bom parâmetro para auxiliar na avaliação da pré-carga do ventrículo esquerdo. Depois deste procedimento, o volume insuflado no balão do cateter de Swan-Ganz 7,5-F foi liberado e obteve-se novamente o traçado da pressão da artéria pulmonar (figura 3 C).

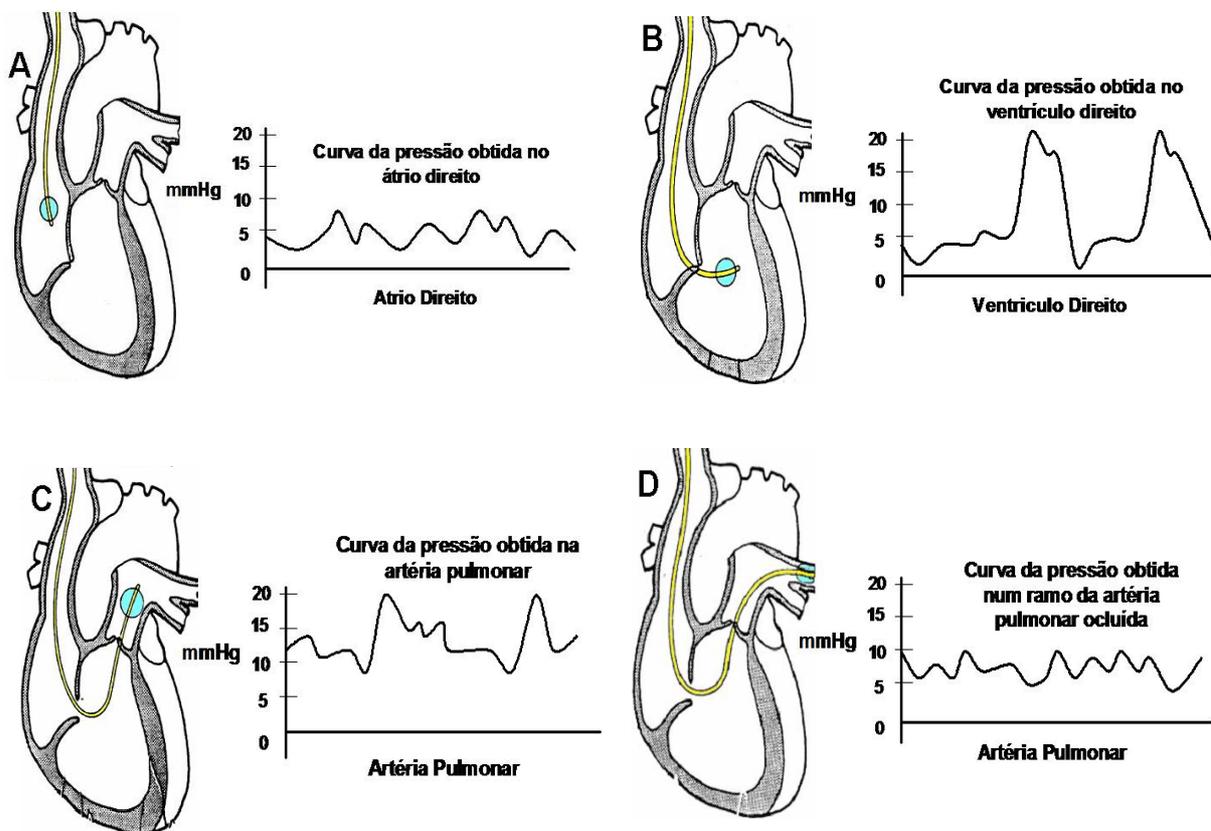


Figura 3: Evolução do cateter de Swan-Ganz ao longo da circulação venosa e registros das curvas de pressões características de cada vaso sanguíneo ou cavidade cardíaca, a saber: átrio direito (A), ventrículo direito (B), artéria pulmonar (C) e artéria pulmonar com um de seus ramos ocluído pelo balão insuflado (D).

#### 4.3. Medida do Débito Cardíaco

A medida adotada para mensuração do débito cardíaco foi o método da termodiluição, técnica mais utilizada para a medida do débito cardíaco. Este método foi descrito pela primeira vez em 1954 por Fegler, mas foi utilizado na prática com o desenvolvimento do cateter de artéria pulmonar (Fegler 1954).

Neste método, o "indicador" é a solução resfriada. Uma quantidade conhecida da solução indicadora, que no caso é mais fria que o sangue, é injetada na via proximal do cateter de Swan Ganz.

A solução indicadora, salina gelada (3mL), foi introduzida de maneira rápida e contínua em bolus no átrio direito (via proximal). Este bolus passa pelo ventrículo direito e é injetado até a artéria pulmonar.

A diferença de temperatura é dada por um termistor posicionado na salina resfriada (aproximadamente 0 °C), enquanto outro termistor, encontrado na extremidade do cateter, registra a temperatura corporal do animal. Imediatamente após a injeção de salina resfriada, o tempo necessário para o retorno à temperatura fisiológica (39,5 – 40,5°C em carneiros saudáveis) é representado na forma de uma curva de variação da temperatura em função do tempo onde temos o tempo do sangue resfriado na horizontal e a temperatura na vertical (ilustrado na figura 4). O volume do débito cardíaco é inversamente proporcional a área formada pela curva. O resultado do débito cardíaco é apresentado de forma digital na tela do monitor, que usando uma fórmula convencional, calcula o volume de sangue bombeado pelo coração por minuto, sendo o débito cardíaco (DC) expresso em L/minuto.

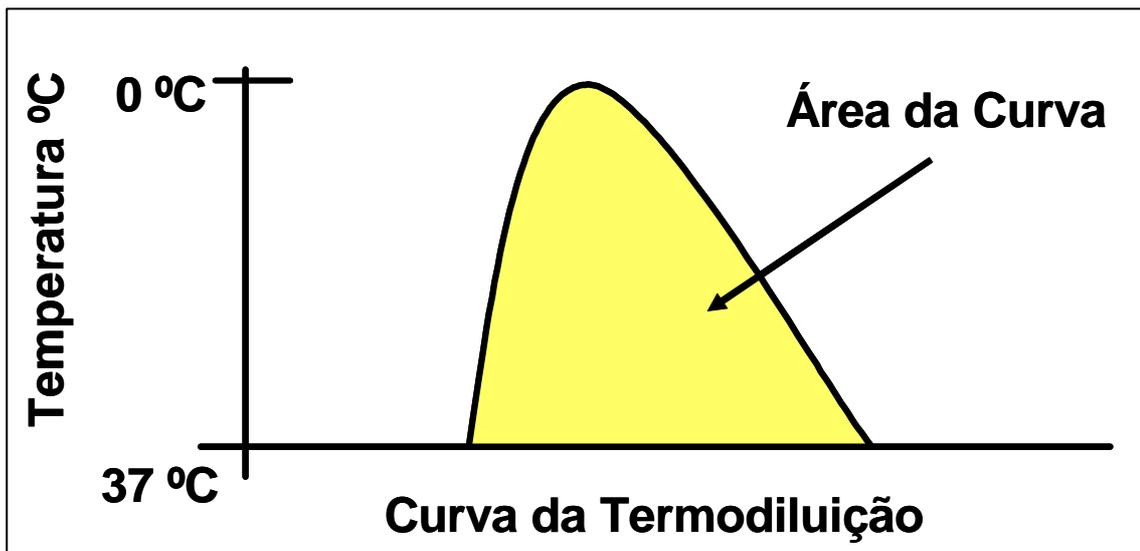


Figura 4: Ilustração esquemática da curva de termodiluição.

#### 4.4. Cálculo dos parâmetros hemodinâmicos

Os parâmetros hemodinâmicos calculados foram: Resistência Vascular Sistêmica (RVS), Índice de RVS (IRVS), Resistência Vascular Pulmonar (RVP), Índice de RVP (IRVP) e Índice Cardíaco (IC), através das seguintes fórmulas:

$$RVS = \frac{PAM - PVC}{DC} \times 80$$

$$IRVS = \frac{PAM - PVC}{IC} \times 80$$

$$RVP = \frac{PMAP - Poap}{DC} \times 80$$

$$IRVP = \frac{PMAP - Poap}{IC} \times 80$$

Onde 80 é uma constante que converte mmHg/L/min em dina.s/cm<sup>5</sup>/m<sup>2</sup> e IC é o índice cardíaco, que foi calculado conforme a fórmula a seguir:

$$IC = \frac{DC}{ASC}$$

Onde ASC é a área de superfície corpórea e foi calculada segundo a fórmula abaixo: (Wood 2002)

$$ASC = \{ \text{peso (kg)} \}^{0,425} \times \{ \text{altura(m)} \}^{0,007184}$$

#### 4.5. Droga utilizada

Neste trabalho experimental utilizamos o Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidine 1-oxil) como ferramenta farmacológica. Foi fornecido pela empresa Sigma Aldrich, EUA. Minutos antes do início da infusão 1,0 mg/Kg/min foi pesado e diluído em salina à temperatura ambiente e protegido da luz.

#### 4.6. Protocolo experimental

O seguinte esquema ilustra o protocolo experimental a ser detalhado:

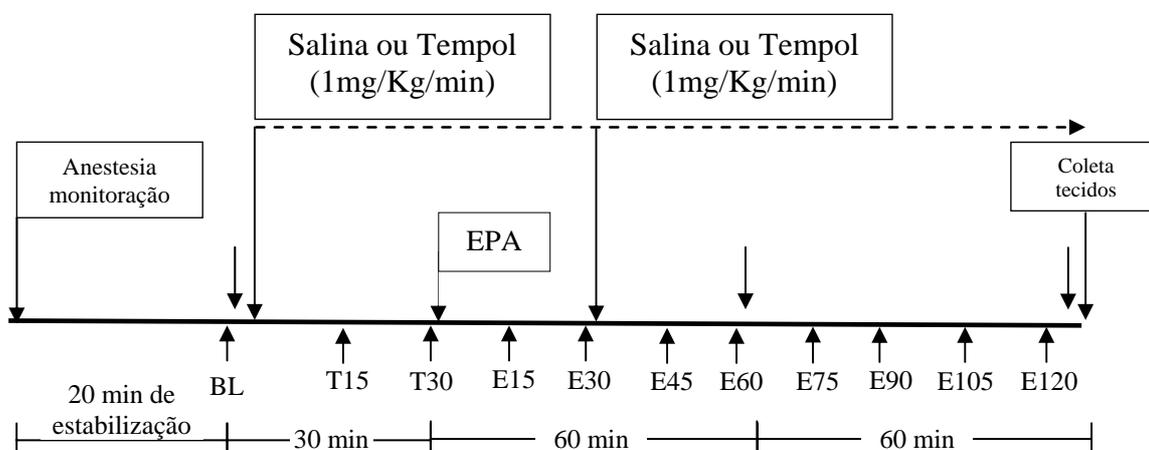


Figura 5: Desenho esquemático do protocolo experimental

Após o primeiro acesso venoso, foram colhidos 2 mL/kg de sangue venoso do animal com agulha e seringa estéreis. Este sangue foi acondicionado em placa de vidro por 1 hora para a formação de coágulos. Então, o coágulo foi cortado e passado através de uma peneira (tamis), de poros iguais a 3 mm. Assim, conseguimos coágulos de 2-3 mm de diâmetro. Tais coágulos foram pesados e misturados a 10 mL de salina 0,9%, 5 minutos antes da indução da embolia, de maneira que cada animal recebeu 0,25 /Kg de trombo.

O estudo foi composto por 4 grupos experimentais:

**# Grupo Sham** (n=4): recebeu apenas a infusão de salina durante o período experimental.

**# Grupo EPA** (n=8): recebeu infusão de salina como pré-tratamento seguido de infusão de coágulos autólogos (0,25g/kg).

**# Grupo Tempol+EPA** (n=7): recebeu pré-tratamento com tempol (1,0 mg/kg/min) seguido de infusão de coágulos autólogos (0,25g/kg).

**# Grupo EPA+Tempol** (n=8): recebeu infusão de coágulos (0,25g/Kg) seguido de tratamento com tempol (1,0 mg/Kg/min).

Após anestesia, monitoração e estabilização hemodinâmica por 20 minutos, foi feita a avaliação hemodinâmica inicial (Basal) utilizando os parâmetros hemodinâmicos (descritos na seção 4.1). Depois de finalizada a avaliação hemodinâmica do momento basal os animais pertencentes aos grupos tempol+EPA receberam pré-tratamento com tempol (1,0 mg/kg/min) (Majid, Nishiyama et al. 2005; Dutta, Lane et al. 2006), trinta minutos antes da indução da EPA, e os animais pertencentes aos grupos Sham e EPA receberam apenas infusão de salina como

pré-tratamento. A embolia foi induzida por infusão dos coágulos autólogos por aproximadamente 15 minutos com o auxílio de uma seringa estéril conectada ao cateter inserido no ventrículo direito. Em seguida, foram feitas avaliações hemodinâmicas nos respectivos momentos: T15, T30; correspondentes a 15 e 30 minutos de infusão do tempol no grupo tratado e E15, E30, E45, E60, E75, E90, E105 e E120, correspondentes a 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos após a infusão de salina no grupo Sham; ou infusão de salina seguida pela indução da embolia no grupo EPA; ou infusão de tempol antes da indução da embolia no grupo tempol+EPA. A figura 5 ilustra o procedimento experimental descrito.

Nos momentos Basal, E60 e E120 foram coletados 3mL de sangue arterial adicionados a tubos contendo heparina e EDTA para a separação do plasma por centrifugação (1000g por 10 minutos) e armazenamento a -70°C para posteriores análises bioquímicas. Nestes mesmos momentos foram coletados mais 4 mL de sangue e colocados em tubo estéril para separação do soro após centrifugação (1000g por 20 minutos). Seguidamente, foram feitas alíquotas de 1 mL e acondicionadas a -70°C para posteriores análises bioquímicas.

Após a avaliação hemodinâmica final os animais foram eutanasiados por meio de injeção intravenosa de cloreto de potássio. Assim que os animais vieram a óbito foi realizada uma toracotomia, pela qual o coração foi rapidamente acessado para a retirada de amostras de tecido do ventrículo direito (VE) e artéria pulmonar (AP) que foram rapidamente congeladas e estocadas a -70 °C e posteriormente utilizadas para as análises bioquímicas que serão melhores descritas na seção 4.6.

## **4.7. Parâmetros bioquímicos**

### **4.7.1. Dosagem de espécies reativas de oxigênio no ventrículo direito**

As concentrações de EROs foram analisadas *in situ*, no ventrículo direito, utilizando dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10µg/mL (Hao, Nishimura et al. 2006; Viel, Benkirane et al. 2008). Trata-se de um marcador que reage com  $O_2^-$  presente nos tecidos resultando na formação de 2-hidroxietídeo e etídeo. O etídeo emite uma fluorescência vermelha no local que é tida como indicador da presença de estresse oxidativo. Inicialmente, os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA,USA), utilizando isopentano e nitrogênio líquido. Eles foram cortados, em criostato, a 5 µm de espessura, e incubados com DHE em uma câmara úmida e escura por 30 minutos. Após este período de incubação os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS). Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a uma câmara fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. A quantificação da intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ.

### **4.7.2. Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia *in situ***

Diferente da zimografia convencional que reflete os níveis das MMPs, este método reflete a atividade *in situ* destas enzimas. Ele permite localizar e quantificar as gelatinases diretamente nos tecidos (Galis, Sukhova et al. 1995).

A atividade das MMPs, *in situ* (ventrículo direito), foi analisada utilizando como substrato DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de

1,0 mg/mL, preparada em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> (Tris a 50 mM, CaCl<sub>2</sub> a 10 mM, ZnCl<sub>2</sub> a 1 μM). Inicialmente, os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando isopentano e nitrogênio líquido; cortados em criostato a 5 μm de espessura, e incubados com o substrato DQ gelatin por 60 minutos em câmara úmida e escura. Após este período, os cortes foram lavados com PBS. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. A atividade gelatinolítica, *in situ*, foi visualizada por uma emissão de fluorescência verde. Para análise e quantificação da atividade, utilizou-se o programa ImageJ.

#### **4.7.3. Determinação dos níveis de MMP-2 e -9 por zimografia em gel**

Método muito utilizado para determinação dos níveis de MMPs no plasma e amostras de tecidos biológicos (Gerlach, Uzuelli et al. 2005; Souza-Tarla, Uzuelli et al. 2005; Souza-Costa, Figueiredo-Lopes et al. 2007). No caso de zimografia de tecidos, é preciso determinar a quantidade de proteína presente em cada amostra, para aplicar no gel a mesma quantidade de proteína por amostra, pois variações protéicas entre uma e outra podem interferir nos resultados finais desse método.

##### **4.7.3.1. Dosagem de proteína pelo método de Bradford**

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford, que consiste em um ensaio colorimétrico quantitativo, em que ao se ligar às proteínas do tecido o reagente adquire uma coloração azul. As amostras do ventrículo direito foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração de proteínas (CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris 20 mM pH 7,4, fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM) e incubadas por 16

horas em geladeira. Para cada 0,1 g de tecido foram acrescentados 300  $\mu$ L do tampão. Após as 16 horas, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, e os sobrenadantes retirados para determinação protéica. A curva padrão foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) diluído em água destilada nas seguintes concentrações em mg/mL: 0,085; 0,175; 0,35; 0,7; 1,4; 2,0; 4,0 e 8,0.

O reagente de Bradford foi utilizado para determinar as concentrações de proteína para cada amostra analisada. A coloração azul desenvolvida no contato com as proteínas pode ser quantificada em espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra. Para cada 5  $\mu$ L de amostra foi adicionado 250  $\mu$ L de reagente de Bradford. Pelos valores obtidos após a leitura, em  $\mu$ g/ $\mu$ L, foi possível aplicar 40  $\mu$ g de proteína no poço do gel.

#### **4.7.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%:**

As amostras foram previamente preparadas com tampão não redutor 2X (SDS 2%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) e aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% e separadas por eletroforese, conforme a técnica SDS-PAGE, que inclui o substrato da enzima (gelatina) no gel de separação, de modo a permitir a evidênciação e quantificação da atividade da MMP. Após o tempo da eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2%, para remover o SDS, e colocados em solução de Tris CaCl<sub>2</sub> 50 mM, por 24 horas, a 37 °C. Posteriormente foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 4 horas. Para a visualização das bandas referentes às MMPs os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético a 10%. Observa-se a formação de bandas claras

contra o fundo azul do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel pelas MMPs).

Para cada gel foi utilizado um padrão interno (soro fetal bovino a 2%). Por ele foi possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, podendo compará-los entre si. A quantificação das bandas da MMP-2 e MMP-9 foi feita utilizando o programa ImageJ. As formas pró e ativa da MMP-2 foram identificadas como bandas em 72 e 67 kDa e as formas pró e ativa da MMP-9 como bandas em 92 e 87 kDa.

#### **4.7.4. Determinação da atividade gelatinolítica total por fluorimetria**

A atividade gelatinolítica total em extrato de coração foi determinada utilizando o kit EnzChek Gelatinase/Collagenase (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA), esse método avalia a atividade gelatinolítica *in vivo* (Lalu, Cena et al. 2006). Antes da execução do ensaio foi realizada a dosagem de proteína das amostras pelo método de Bradford como descrito anteriormente (item 4.6.3.1). Três mil microgramas de proteína de cada amostra foram aplicados nos poços de uma microplaca. Como substrato foi utilizado DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 1,0 mg/mL em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mM. A intensidade de fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro (λexcitação: 495 nm e λemissão: 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, USA), após 120 minutos de incubação a 37 °C. A curva padrão foi preparada conforme recomendado pelo fabricante. Para isso, *Clostridium sp.* Foi diluído em tampão Tris-CaCl<sub>2</sub> 50 mM nas concentrações de 2,0; 1,0; 0,5; e 0,25 μU.

#### **4.7.5. Dosagem da troponina I cardíaca**

A troponina I cardíaca foi dosada em amostras de soro. Trata-se de uma associação do método imunoenzimático tipo sanduíche numa etapa com uma detecção final em fluorescência (ELFA). Para tanto foi utilizado o Kit VIDAS TROPONIN I Ultra – TNIU (Biomérieux – USA). A fase sólida, um cone de utilização única, é recoberta com imunoglobulinas monoclonais de rato anti-troponina I cardíaca. Duzentos microlitros (200µL) de soro foram pipetados no poço-amostra da barrete. Este poço contém anticorpos anti-troponina cardíaca marcados com fosfatase alcalina (conjugado). A mistura da amostra/conjugado foi aspirada e depois dispensada várias vezes no cone. Esta operação permite a troponina ligar-se, por um lado, às imunoglobulinas fixadas no cone, e por outro lado, ao conjugado, formando assim um sanduíche. Os componentes não fixados foram eliminados por lavagens. Em seguida, foram efetuadas duas etapas de revelação sucessivas. Em cada etapa, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) foi aspirado e depois dispensado no cone; a enzima do conjugado catalisou a reação de hidrólise deste substrato num produto (4-metil-umbeliferona) cuja fluorescência emitida foi medida em 450nm. O valor do sinal de fluorescência é proporcional à concentração de antígeno presente na amostra. Terminado o teste, os resultados foram calculados automaticamente pelo aparelho em relação a duas curvas de calibração memorizadas que correspondem às duas etapas de revelação. Um sinal limiar gerou a escolha da curva de calibração a ser utilizada para cada amostra. Em seguida, os resultados foram impressos. A concentração mínima detectável pelo ensaio é de 0,01µg/L.

#### **4.8. Análise Estatística**

Os resultados pertinentes às medidas hemodinâmicas, bem como os parâmetros bioquímicos em amostras de ventrículo direito e soro foram apresentados como média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM).

A comparação entre os grupos experimentais a cada momento experimental foi feita por uma análise de variância de medidas repetidas (ANOVA 2 vias), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. A comparação intragrupo nos momentos basal e final (120 minutos após a embolia) foi feita por uma análise de variância utilizando teste pareado não paramétrico de Wilcoxon.

Para comparar os parâmetros bioquímicos entre grupos foi usada uma ANOVA de medidas não repetidas seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Foi considerado estatisticamente significativo o valor mínimo de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

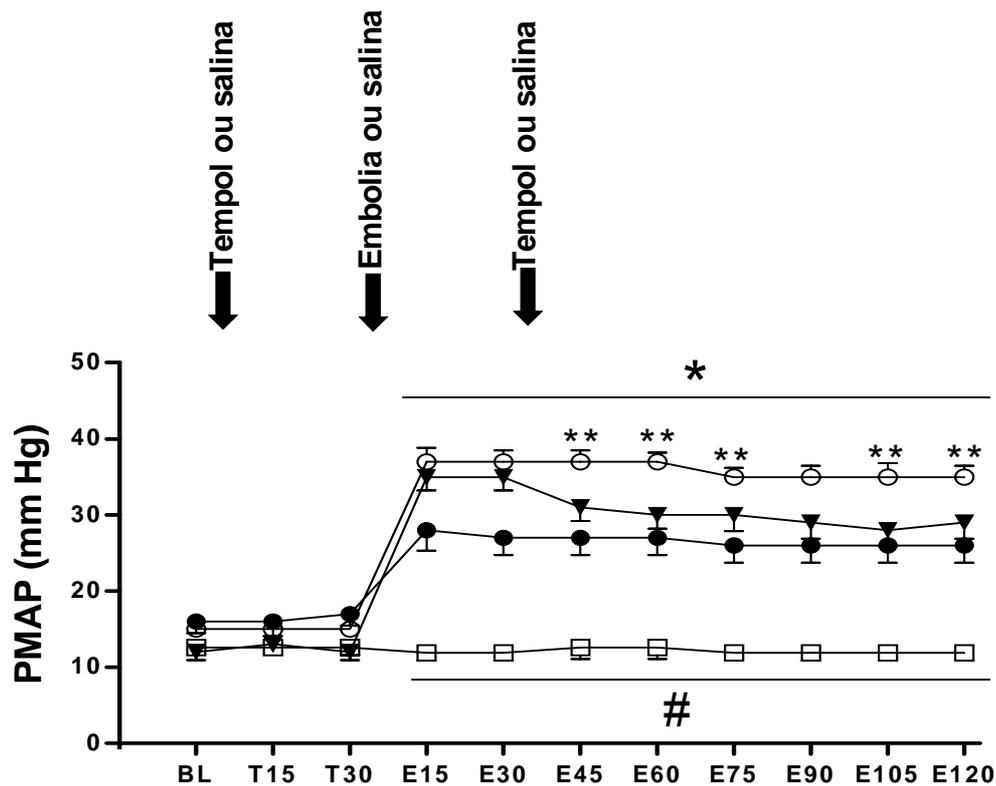
# ***5. Resultados***

---

### **5.1. Efeitos do tempol sobre os parâmetros hemodinâmicos**

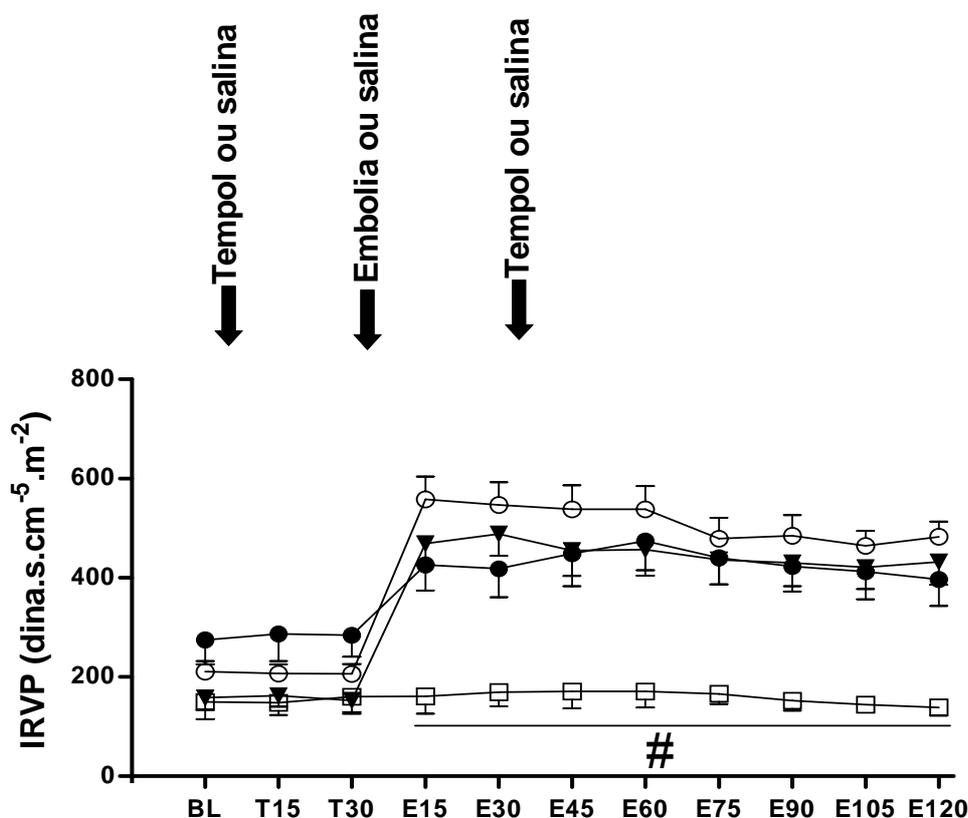
Os parâmetros hemodinâmicos basais, antes da indução da embolia pulmonar aguda (EPA), foram semelhantes nos três grupos experimentais: EPA, tempol+EPA e EPA+tempol. Os dados hemodinâmicos do grupo controle não mostraram mudanças estatisticamente significativas durante todo protocolo experimental (150 minutos de monitoração).

A embolia foi induzida por meio da infusão de 0,25 mg/kg de coágulos do próprio animal num tempo máximo de quinze minutos, quando ao término do procedimento observamos a súbita instalação da hipertensão pulmonar, ocasionando um aumento de 146% na PMAP ( $15 \pm 2$  para  $37 \pm 6$  mmHg), que se manteve constante até o final do experimento. Todos os animais do grupo EPA não mostraram mudanças na PMAP após a hipertensão pulmonar induzida pela embolia, entretanto, a administração endovenosa de tempol trinta minutos antes da indução da embolia ocasionou uma redução de aproximadamente 55% na PMAP ( $16 \pm 2$  para  $26 \pm 2$  mmHg) a qual se manteve estabilizada nestes valores em todos os animais pré-tratados. Uma redução da PMAP de 27% ( $12 \pm 3$  para  $28 \pm 6$  mmHg) foi obtida com a infusão contínua de tempol trinta minutos após a indução da embolia, admitindo-se valores estáveis para todos os animais até o final do experimento, como apresentado na figura 6 e tabela 1.



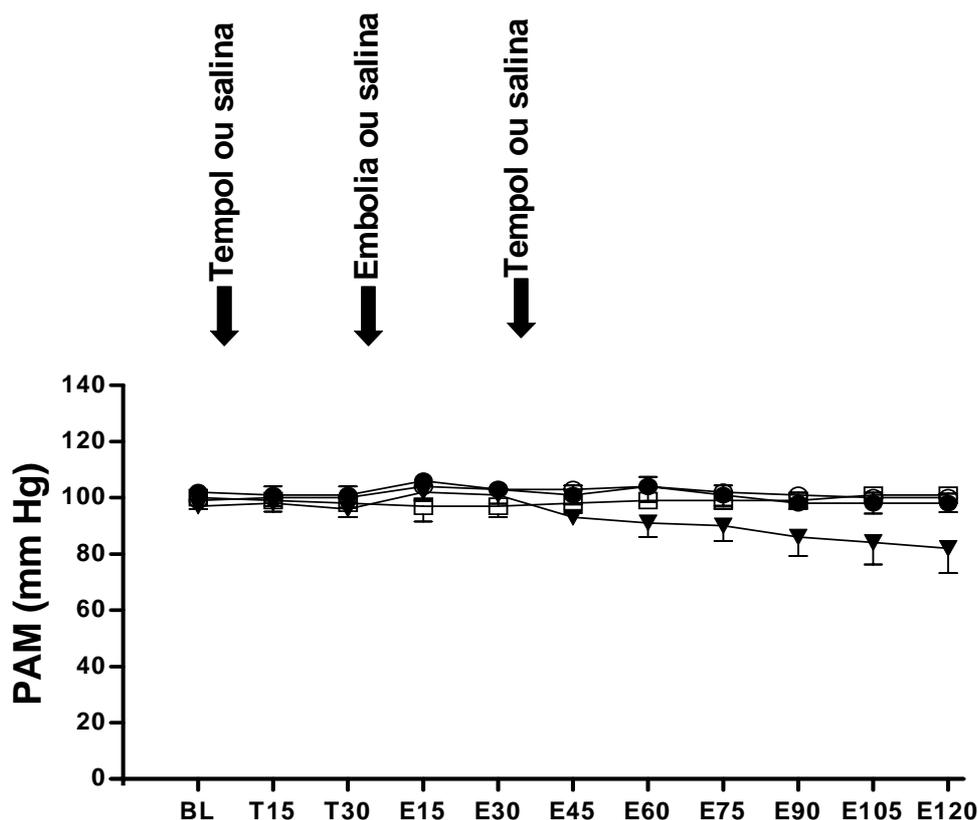
**Figura 6** – Efeito do tempol sobre a **pressão média da artéria pulmonar (PMAP)** em mmHg nos grupos: EPA (○) N=8, Tempol+EPA (●) N=7, EPA+Tempol (▼) N=8 e Sham (□) N=4; nos momentos basal (BL), T15 e T30 (correspondentes a 15 e 30 minutos após infusão do tempol no grupo Tempol+EPA e salina no grupo EPA e Sham) e E15 a E120 (correspondentes ao período de 2 horas de indução da embolia nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol). Grupo Tempol+EPA vs EPA (\* $p < 0,05$ ); grupo EPA+tempol vs EPA (\*\* $p < 0,05$ ); grupo EPA vs Sham (# $p < 0,001$ ) – ANOVA 2 vias+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

O índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) aumentou 164% ( $211 \pm 71$  para  $558 \pm 153$  dina.s.cm<sup>-5</sup>.m<sup>-2</sup>) no grupo EPA após a hipertensão pulmonar induzida pela embolia como apresentado na figura 7. Contudo, não foi observada redução estatisticamente significativa deste parâmetro durante a administração endovenosa de tempol trinta minutos antes ou após a indução da embolia (figura 7 e tabela 2).



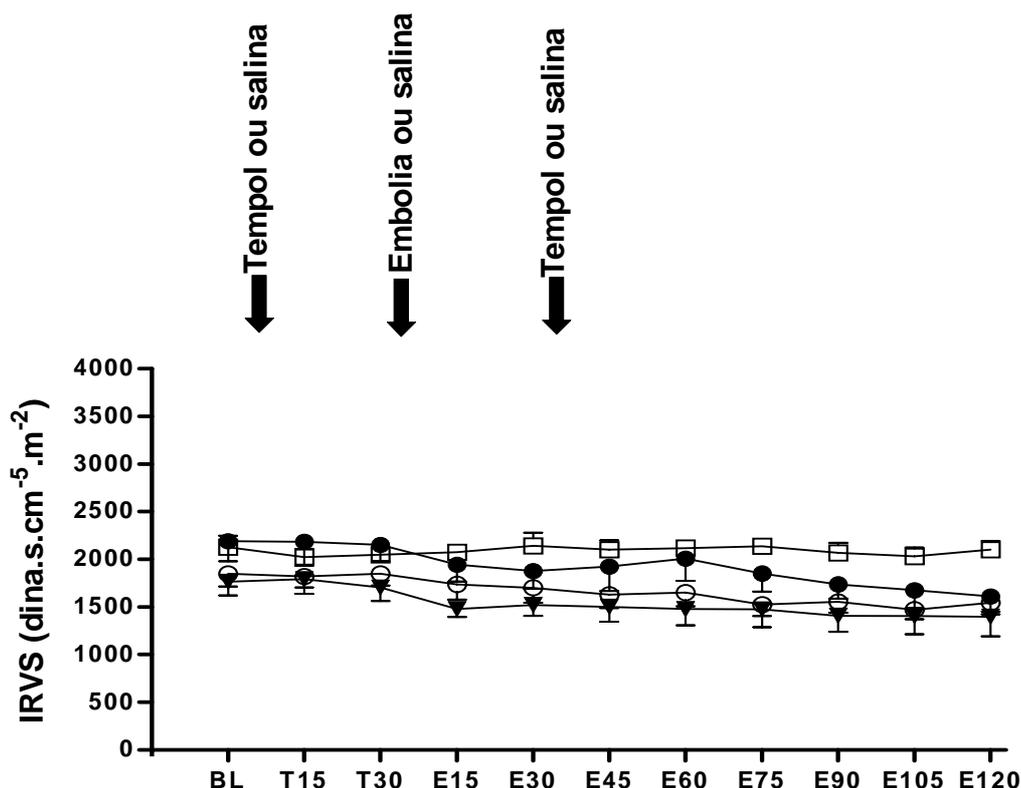
**Figura 7** – Efeito do tempol sobre o **índice de resistência vascular pulmonar (IRVP)** em dina.s.cm<sup>-5</sup>.m<sup>-2</sup> nos grupos: EPA (○) N=8, Tempol+EPA (●) N=7, EPA+Tempol (▼) N=8 e Sham (□) N=4; nos momentos basal (BL), T15 e T30 (correspondentes a 15 e 30 minutos após infusão do tempol no grupo Tempol+EPA e salina no grupo EPA e Sham) e E15 a E120 (correspondentes ao período de 2 horas de indução da embolia nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol) – ANOVA 2 vias+pós-teste Bonferroni. Grupo EPA vs Sham (#p<0,05). Os valores são as médias ± Erro padrão da média.

A indução da EPA não causou diferenças significativas na pressão arterial média (PAM) nos diferentes grupos, apenas ocorreram pequenas flutuações que não foram estatisticamente significativas nos grupos durante todo o experimento (figura 8 e tabela 3).



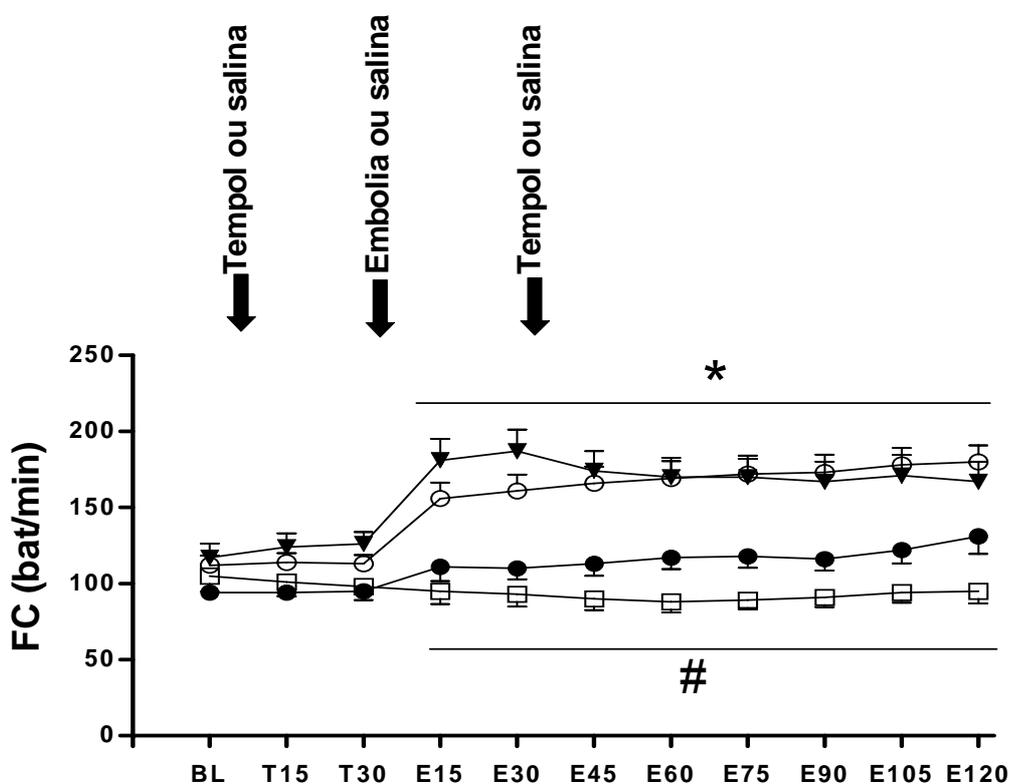
**Figura 8** – Efeito do tempol sobre a **pressão arterial média (PAM)** em mmHg nos grupos: EPA (○) N=8, Tempol+EPA (●) N=7, EPA+Tempol (▼) N=8 e Sham (□) N=4; nos momentos basal (BL), T15 e T30 (correspondentes a 15 e 30 minutos após infusão do tempol no grupo Tempol+EPA e salina no grupo EPA e Sham) e E15 a E120 (correspondentes ao período de 2 horas de indução da embolia nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol). Grupo Tempol+EPA vs EPA; grupo EPA+Tempol vs EPA; grupo EPA vs Sham (NS  $p>0,05$ ) – ANOVA 2 vias+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

De maneira semelhante ao ocorrido com a PAM as mudanças no índice de resistência vascular sistêmico (IRVS) após a hipertensão pulmonar induzida pela EPA nos diferentes grupos não alcançaram valores estatisticamente significativos como apresentados na figura 9 e tabela 4.



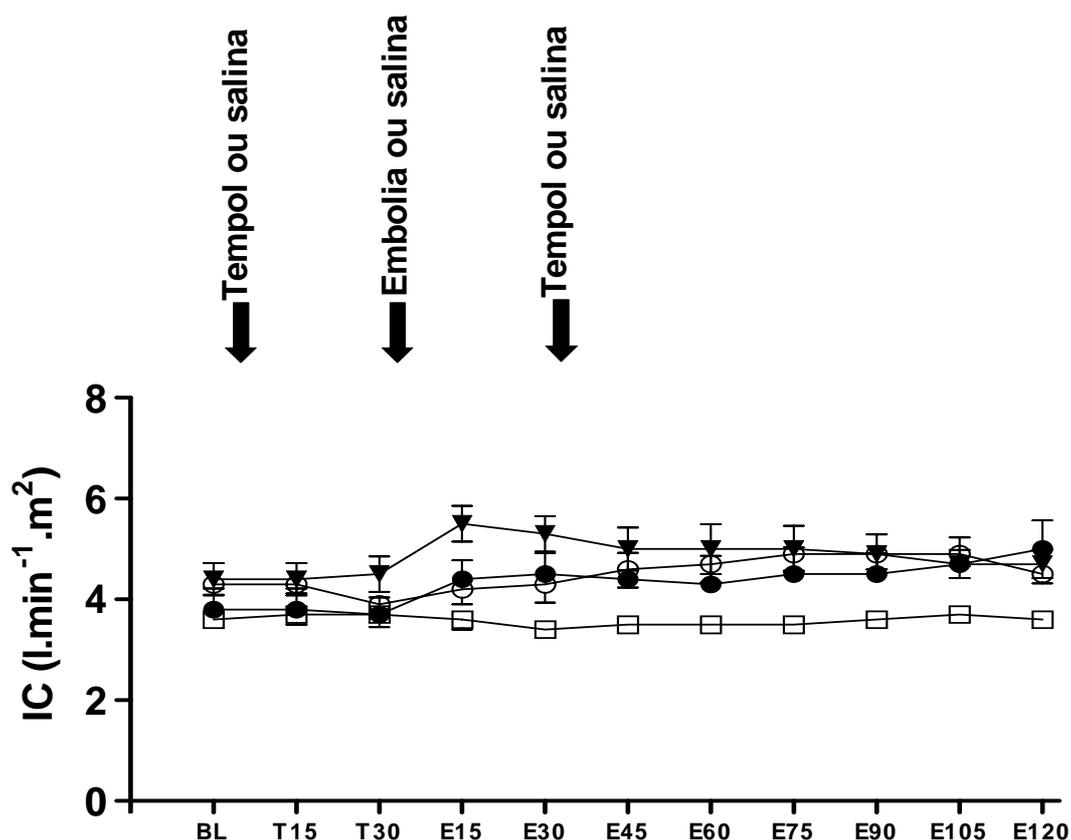
**Figura 9** – Efeito do tempol sobre o índice de resistência vascular sistêmico (IRVS) em  $\text{dina.s.cm}^{-5}.\text{m}^{-2}$  nos grupos: EPA (○) N=8, Tempol+EPA (●) N=7, EPA+Tempol (▼) N=8 e Sham (□) N=4; nos momentos basal (BL), T15 e T30 (correspondentes a 15 e 30 minutos após infusão do tempol no grupo Tempol+EPA e salina no grupo EPA e Sham) e E15 a E120 (correspondentes ao período de 2 horas de indução da embolia nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol). Grupo Tempol+EPA vs EPA; grupo EPA+Tempol vs EPA, grupo EPA vs Sham (NS  $p>0,05$ ) - ANOVA 2 vias+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

A indução da EPA aumentou a frequência cardíaca (FC) em 60% ( $112 \pm 21$  para  $180 \pm 36$  batimentos/min), como apresentado na figura 10. A administração endovenosa de tempol trinta minutos antes da indução da embolia pulmonar aguda reduziu a FC em 76% ( $94 \pm 3$  para  $110 \pm 7$  batimentos/min), entretanto quando infundido trinta minutos após a EPA ele não foi capaz de exercer os mesmos efeitos, segundo mostrado na figura 10 e tabela 5.



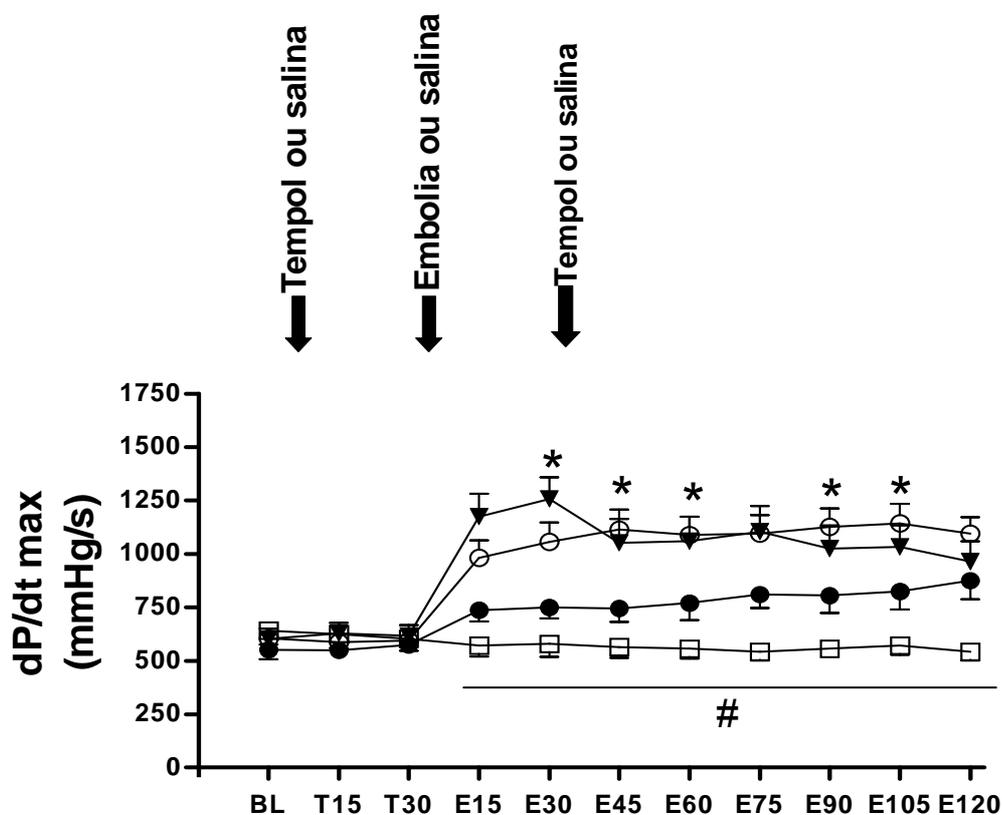
**Figura 10** – Efeito do tempol sobre a **frequência cardíaca (FC)** em batimentos por minuto nos grupos: EPA (○) N=8, Tempol+EPA (●) N=7, EPA+Tempol (▼) N=8 e Sham (□) N=4; nos momentos basal (BL), T15 e T30 (correspondentes a 15 e 30 minutos após infusão do tempol no grupo Tempol+EPA e salina no grupo EPA e Sham) e E15 a E120 (correspondentes ao período de 2 horas de indução da embolia nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol). Grupo Tempol+EPA vs EPA (\* $p < 0,05$ ); Grupo EPA vs Sham (# $p < 0,001$ ) – ANOVA 2 vias+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

A hipertensão pulmonar induzida pela EPA não ocasionou mudança estatisticamente significativa no índice cardíaco (IC), somente uma pequena oscilação que se manteve até o final do experimento (figura 11 e tabela 6).



**Figura 11** – Efeito do tempol sobre o **índice cardíaco (IC)** em l.min<sup>-1</sup>.m<sup>2</sup> nos grupos: EPA (○) N=8, Tempol+EPA (●) N=7, EPA+Tempol (▼) N=8 e Sham (□) N=4; nos momentos basal (BL), T15 e T30 (correspondentes a 15 e 30 minutos após infusão do tempol no grupo Tempol+EPA e salina no grupo EPA e Sham) e E15 a E120 (correspondentes ao período de 2 horas de indução da embolia nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol). Grupo Tempol+EPA vs EPA; grupo EPA+Tempol vs EPA, grupo EPA vs Sham (NS p>0,05) – ANOVA 2 vias+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias ± Erro padrão da média.

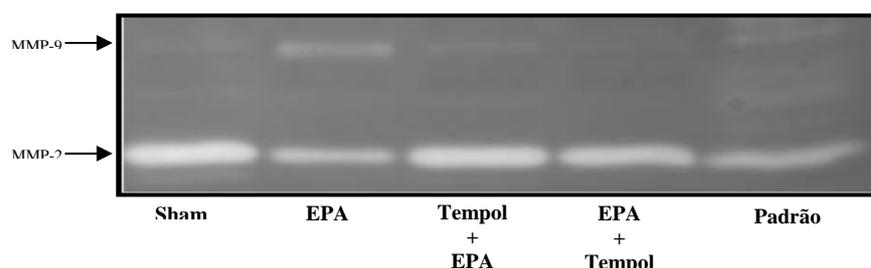
A força de contração sistólica do miocárdio, interpretado pela variável dP/dt máxima, do ventrículo direito sofreu um aumento de 89% ( $605 \pm 112$  para  $1143 \pm 309$ ) em consequência da embolia pulmonar aguda. A administração prévia do tempol, trinta minutos antes da indução da EPA, diminuiu a dP/dt máxima em 65% ( $553 \pm 45$  para  $737 \pm 53$ ), apesar de que no grupo EPA+tempol tenha mostrado uma tendência à redução (figura 12 e tabela 7).



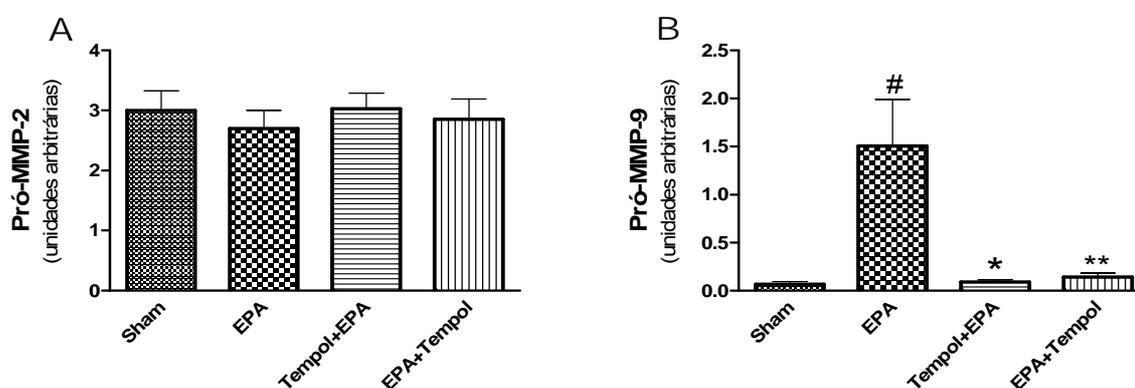
**Figura 12** – Efeito do tempol sobre a **dP/dt máxima** do ventrículo direito em mmHg/s nos grupos: EPA (○) N=8, Tempol+EPA (●) N=7, EPA+Tempol (▼) N=8 e Sham (□) N=4; nos momentos basal (BL), T15 e T30 (correspondentes a 15 e 30 minutos após a infusão do tempol no grupo Tempol+EPA e salina no grupo EPA e Sham) e E15 a E120 (correspondentes ao período de 2 horas de indução da embolia nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol). Grupo Tempol+EPA vs EPA (\* $p < 0,05$ ); EPA vs Sham (# $p < 0,05$ ) – ANOVA 2 vias+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

## 5.2. Efeitos do tempol sobre as MMP-2 e -9

Em se tratando do ensaio de zimografia nas amostras de ventrículo direito, os níveis da MMP-2 não tiveram variação significativa após a EPA (figura 14A), entretanto, os níveis da MMP-9 aumentaram substancialmente após a indução da embolia pulmonar aguda. O pré-tratamento com tempol, bem como o tratamento com tempol trinta minutos após a EPA diminuíram os níveis da MMP-9 no ventrículo direito para valores basais (figura 14B).

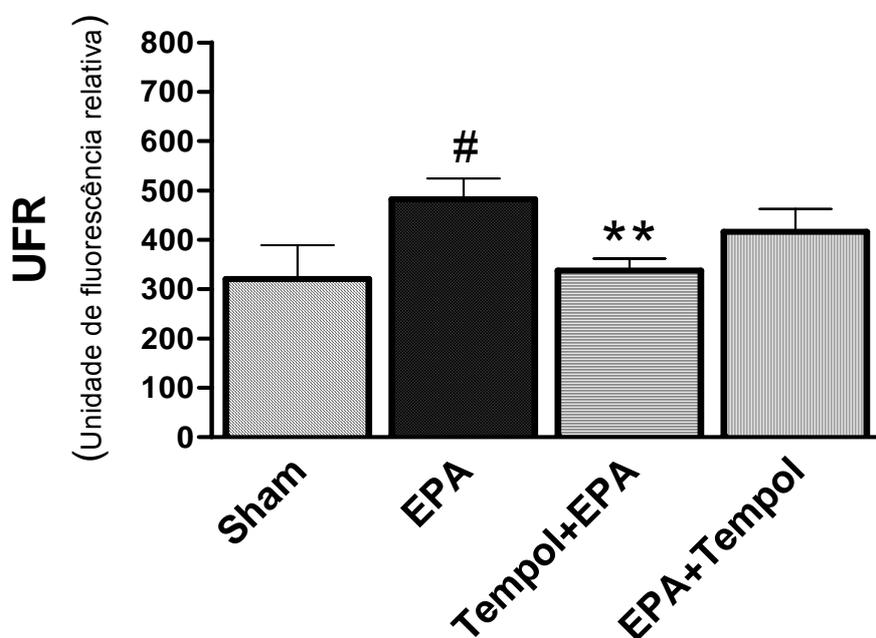


**Figura 13: Gel de zimografia do ventrículo direito.** Exibição das bandas características de pró-MMP-2 e pró-MMP-9 nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8).



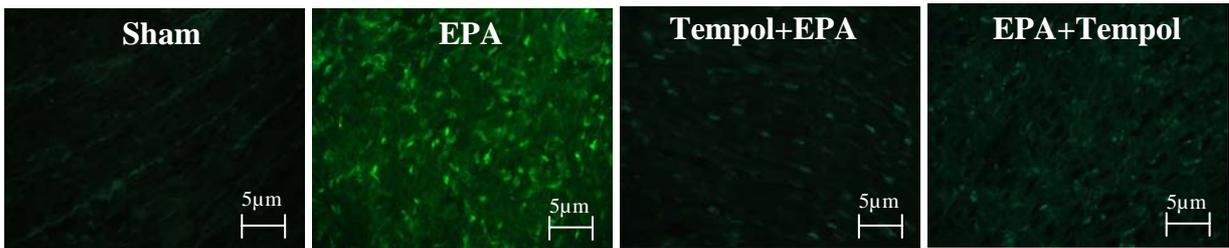
**Figura 14: Quantificação das MMP-2 e -9 pelo método da zimografia.** Níveis de MMP-2 e MMP-9 em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda nos grupos EPA, Tempol+EPA, EPA+Tempol ou salina no grupo Sham. EPA vs Sham (# $p < 0,05$ ); Tempol+EPA vs EPA (\* $p < 0,05$ ); EPA+Tempol vs EPA (\*\* $p < 0,05$ ) - ANOVA 1 via+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

No ensaio que avalia a atividade gelatinolítica das MMPs, utilizando um kit de atividade gelatinolítica, notou-se que a indução da embolia pulmonar aguda promoveu um aumento da atividade das gelatinases no grupo EPA quando comparado ao grupo Sham. O pré-tratamento com tempol diminuiu a atividade das gelatinases de forma significativa quando comparado ao grupo EPA (Figura 16). Quando infundido trinta minutos após a EPA seu efeito sobre a atividade enzimática não foi significativamente diferente (figura 15).

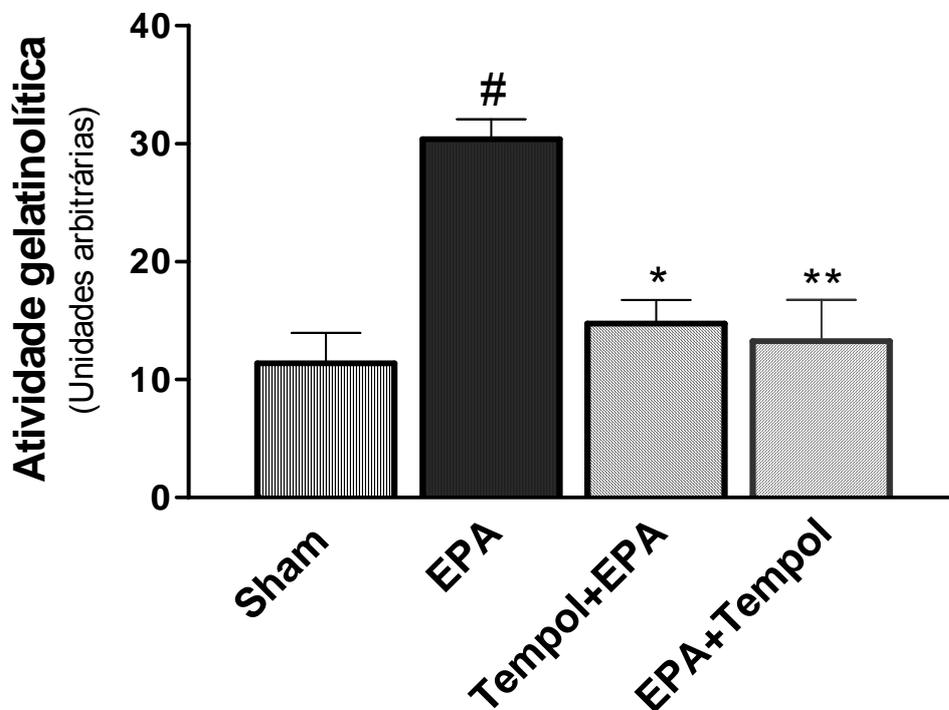


**Figura 15: Avaliação da atividade das MMP-2 e -9 utilizando um kit de atividade gelatinolítica.** Atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol ou salina no grupo Sham. Grupo EPA vs Sham (# $p < 0,05$ ), grupo Tempol+EPA vs EPA (\*\* $p < 0,05$ ) - ANOVA 1 via+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

Outro ensaio realizado com o propósito de avaliar a atividade das gelatinases foi a zimografia *in situ*. A indução da embolia pulmonar aguda promoveu um aumento evidente da atividade das gelatinases em cortes histológicos do ventrículo direito dos animais do grupo EPA quando comparados aos animais do grupo Sham. Tanto o pré-tratamento quanto o tratamento com tempol reduziu de forma significativa a atividade das gelatinases (figura 16 e 17).



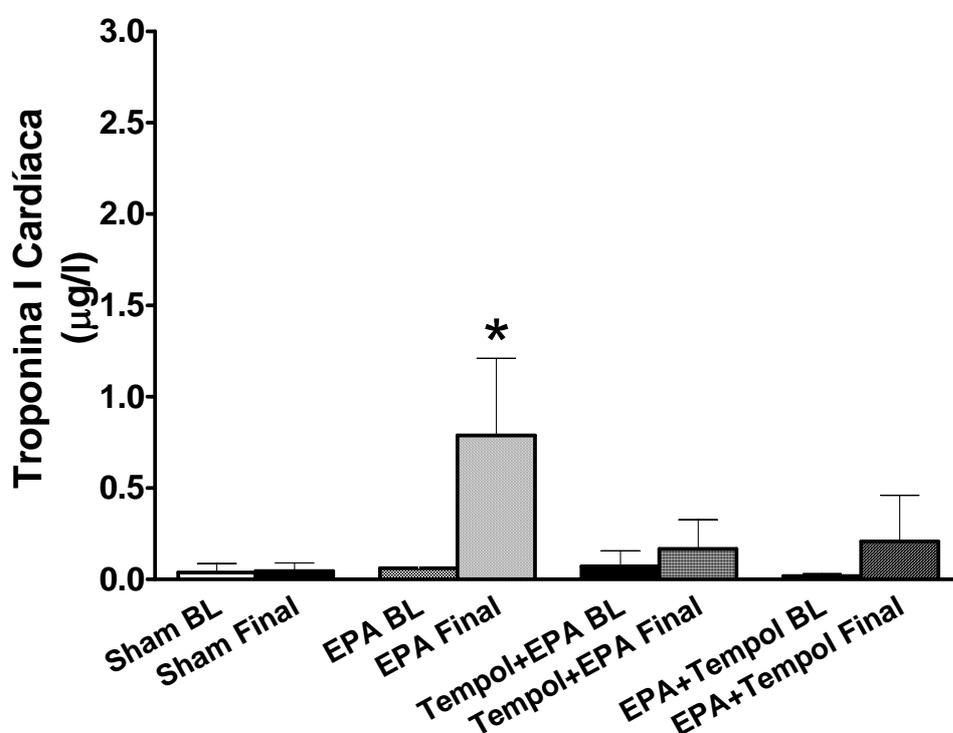
**Figura 16:** Fotografia de cortes de ventrículo direito de carneiros nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8).



**Figura 17:** Avaliação da atividade das MMP-2 e -9 pelo método da zimografia *in situ*. Atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol ou salina no grupo Sham. Grupo Tempol+EPA vs EPA (\* $p < 0,05$ ); grupo EPA+Tempol vs EPA (\*\* $p < 0,05$ ), grupo EPA vs Sham (# $p < 0,05$ ) - ANOVA 1 via+pós-teste Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

### 5.3. Efeitos do tempol sobre a troponina I cardíaca (TnIc)

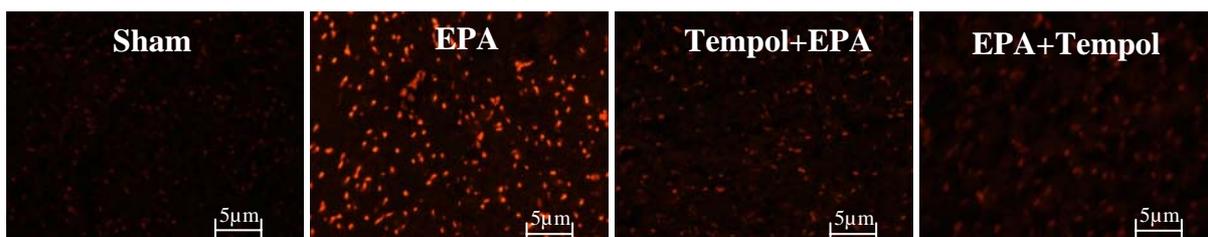
Com relação aos resultados da troponina I cardíaca, os animais do grupo Sham não apresentaram mudanças significativas. Entretanto a indução da embolia pulmonar aguda foi associada com aumento significativo da troponina I cardíaca no soro dos animais do grupo EPA. Nos grupos pré-tratados ou tratados com tempol não houve aumento significativo da troponina I cardíaca (figura 18).



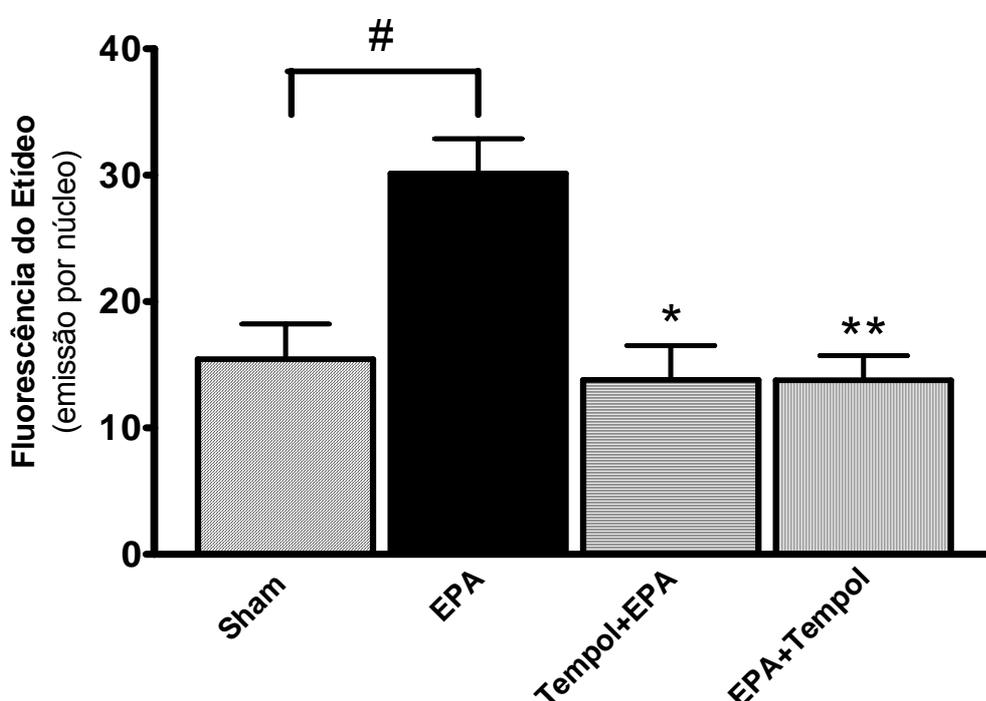
**Figura 18: Avaliação da concentração de troponina I cardíaca pelo método de imunoensaio enzimático e fluorescência.** Concentração de troponina I no soro nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8) nos momentos basal (BL) e final (120 minutos após a indução da tromboembolia pulmonar aguda nos grupos EPA, Tempol+EPA e EPA+Tempol ou salina no grupo Sham). Grupo EPA Final vs EPA BL (\* $p < 0,05$ ) - Teste de Wilcoxon. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

#### **5.4. Efeitos do tempol sobre as espécies reativas de oxigênio (EROs)**

O ensaio utilizando dihidroetídeo (DHE) foi realizado para analisar os níveis de espécies reativas de oxigênio no coração (ventrículo direito). Observamos níveis maiores de fluorescência de etídeo no miocárdio dos animais do grupo EPA em comparação aos animais do grupo Sham, ao passo que nos animais do grupo Tempol+EPA e EPA+Tempol observamos níveis de fluorescência similares aos animais do grupo Sham (figura 19 e 20).



**Figura 19:** Fotografia de cortes de ventrículo direito de carneiros nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8).



**Figura 20: Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelo método de DHE.** Níveis de espécies reativas de oxigênio em amostras de ventrículo direito nos grupos Sham (N=4), EPA (N=8), Tempol+EPA (N=7) e EPA+Tempol (N=8) 120 minutos após a indução da embolia pulmonar aguda nos grupos EPA, Tempol+EPA, EPA+Tempol ou salina no grupo Sham. Grupo Tempol+EPA vs EPA (\* $p < 0,05$ ); grupo EPA+Tempol vs EPA (\*\* $p < 0,05$ ), grupo EPA vs Sham (# $p < 0,05$ ) - ANOVA 1 via+pós-teste de Bonferroni. Os valores são as médias  $\pm$  Erro padrão da média.

## ***6. Discussão***

---

Neste estudo demonstramos pela primeira vez que o tempol (antioxidante amplamente descrito) atenua algumas das alterações hemodinâmicas instaladas após a embolia pulmonar aguda (EPA) em carneiros. Os animais embolizados com trombos autólogos do grupo EPA tiveram aumentos tanto da pressão média arterial pulmonar (PMAP) quanto do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP), caracterizando a hipertensão pulmonar aguda induzida por EPA. Em contraste, os aumentos da PMAP dos animais do grupo tempol+EPA (pré-tratados com tempol na dose de 1mg/Kg/min trinta minutos antes da indução da EPA) foram menos intensos que do grupo EPA, observando-se uma queda ao longo do tempo, que foi significativa 120 minutos após a indução da embolia. Quando infundido trinta minutos após a EPA (grupo EPA+tempol) o tempol reproduziu os mesmos efeitos, de maneira que a queda da PMAP se manteve significativamente menor durante os 90 minutos seguintes à instalação da EPA. Estes resultados sugerem que o estresse oxidativo participa do processo de hipertensão pulmonar induzida por EPA, e que a inibição dos radicais livres por atuação de antioxidantes possa ser utilizada para atenuar alguns dos distúrbios hemodinâmicos veiculado à ela. Esta sugestão é apoiada tanto por achados experimentais em nosso laboratório, que indicam uma relação entre a redução da hipertensão pulmonar relacionada à EPA devido aos efeitos antioxidantes (Dikshit, Srivastava et al. 1989; Souza-Costa, Zerbini et al. 2005), quanto pelos nossos demais resultados descritos a seguir.

Devido ao aumento da pressão média na artéria pulmonar (PMAP) a pós-carga do ventrículo direito eleva-se consistentemente, de maneira que é a região do coração mais comprometida durante o processo de embolia. Desta forma se constitui uma importante área para análises histológicas.

Em nossos achados, associado à redução da PMAP, o pré-tratamento (trinta minutos antes da indução da EPA) e o tratamento (trinta minutos após a EPA) com tempol reduziram significativamente os níveis de radicais livres no ventrículo direito, fazendo com que se tornassem próximos aos observados no grupo sham.

Estes resultados são apoiados por outros trabalhos desenvolvidos tanto com animais quanto em estudos clínicos. Alguns estudos em modelo animal de tromboembolia mostraram um aumento na peroxidação lipídica e produção de radicais livres (Dikshit, Srivastava et al. 1989; Souza-Costa, Zerbini et al. 2005). Em se tratando de estudos clínicos, pacientes com embolia pulmonar aguda maciça e sub-maciça apresentaram um aumento no marcador de peroxidação lipídica, MDA plasmático; produção de radicais livres e alterações na atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) plasmática (Muhl, Furedi et al. 2006).

Além da participação do estresse oxidativo na instalação da hipertensão pulmonar induzida pela EPA, um crescente corpo de evidências indicam que superóxidos e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) contribuem para vasoconstrição pulmonar hipóxica (Waypa, Chandel et al. 2001), um aspecto fisiopatológico presente na EPA (Stratmann e Gregory 2003), amplamente discutido como uma das principais causas da hipertensão pulmonar desenvolvida após instalação da embolia. A administração de superóxido dismutase (SOD) tem sido eficaz em atenuar de maneira significativa a vasoconstrição induzida por hipóxica em artéria pulmonar isolada de ratos (Thompson, Jones et al. 1998) e de porcos (Liu, Zelko et al. 2006).

O tempol, amplamente descrito como mimético da SOD, é um composto permeável à membrana e eficiente sequestrador de radicais livres (Nilsson, Olsson

et al. 1989). Seus efeitos antioxidantes tem sido atribuído principalmente à dismutação de radicais superóxidos e radicais hidroxil (Thiemermann 2003; Sainz, Wangensteen et al. 2005), embora haja outros trabalhos apresentando interação deste composto com diferentes radicais. Esta droga tem sido amplamente descrita por diferentes autores e diferentes épocas ser um agente altamente eficiente em reduzir a pressão arterial sistêmica nos mais diversos modelos animais de hipertensão sistêmica (Wilcox e Pearlman 2008). Em se tratando dos efeitos do tempol sobre hipertensão arterial pulmonar induzida por EPA, estes são os primeiros achados experimentais.

Paralelo à redução do estresse oxidativo encontramos uma redução significativa na atividade gelatinolítica da MMP-9, no ventrículo direito dos carneiros embolizados tratados com tempol antes e após a indução da embolia. Estes achados corroboram estudos recentes realizados em nosso laboratório que apresentam a participação das MMPs, em particular as MMPs -2 e -9, no processo da hipertensão pulmonar aguda associada a EPA (Palei, Zaneti et al. 2005; Souza-Costa, Zerbini et al. 2005; Fortuna, Figueiredo-Lopes et al. 2007; Souza-Costa, Figueiredo-Lopes et al. 2007). O mecanismo preciso envolvido neste aumento das MMPs circulantes após a tromboembolia pulmonar permanece por ser esclarecido, entretanto, tem sido demonstrado em modelo experimental de EPA que há ocorrência de resposta inflamatória e influxo de neutrófilos e macrófagos para a intimidade do ventrículo direito e artéria pulmonar (Eagleton, Henke et al. 2002), o que não rejeita a possibilidade do próprio tecido pulmonar isquêmico gerar resposta inflamatória contribuindo para o aumento de MMPs. Assim, é possível que células

inflamatórias possam rapidamente liberar grânulos contendo grande quantidade de MMP-9 (Fernandez-Patron, Zouki et al. 2001; Van den Steen, Dubois et al. 2002).

As MMPs podem ser ativadas por clivagem proteolítica no meio extracelular transformando-se em uma forma enzimaticamente ativa (O'Connor and FitzGerald 1994). Dentre outras maneira de ativação, sabe-se que as espécies reativas de oxigênio podem modular a ativação das MMPs, possivelmente pela reação das espécies reativas de oxigênio com o resíduo de cisteína presente no pró-peptídeo das MMPs, promovendo uma ruptura do grupamento tiol com o zinco, resultando em sua ativação (Okamoto, Akaike et al. 2001). Tendo isto em vista, é possível sugerir que o tempol desenvolva seus efeitos antioxidantes reduzindo os níveis de radicais livres e conseqüentemente a ativação das MMPs. Isto é razoável, visto que as MMPs modulam as ações de alguns peptídeos vasoativos liberados durante a EPA que promovem hipertensão pulmonar, a exemplo da big-endotelina (big-ET), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e adrenomedulina (ADM). A big-ET (peptídeo vasoconstritor) é clivado pela MMP à endotelina 1-32, que tem ação vasoconstritora mais potente que àquela produzida pela endotelina-1 (Fernandez-Patron, Radomski et al. 1999). A adrenomedulina (peptídeo vasodilatador) uma vez clivada pela MMP gera tanto produtos vasoconstritores como vasodilatadores, enquanto que o CGRP (neuropeptídeo vasodilatador relacionado ao gene da calcitonina) tem seus efeitos suprimidos após sua clivagem (Fernandez-Patron, Stewart et al. 2000; Martinez, Oh et al. 2004). Dessa forma, o efeito antioxidante do tempol agiria indiretamente sobre as enzimas da matriz extracelular reduzindo seus efeitos deletérios contribuintes para as alterações instaladas após a EPA.

Embora vários estudos em diferentes modelos de hipertensão sistêmica tenham mostrado que o tempol reduz a pressão arterial sistêmica (Shokoji, Nishiyama et al. 2003), em nosso protocolo a dose de 1mg/kg/min de tempol não ocasionou mudanças significativas na pressão arterial sistêmica e no IRVS. Estes achados sugerem que o tempol produziu efeitos fundamentalmente sobre a circulação pulmonar.

A função cardíaca ou contratilidade cardíaca tem sido objeto de estudo em muitas doenças debilitantes do coração. Durante a EPA a obstrução parcial ou total da circulação arterial pulmonar ocasiona o aumento da pressão na artéria pulmonar que, por conseguinte, gera uma diminuição do volume de enchimento do ventrículo esquerdo (VE) e o aumento da pós-carga do ventrículo direito (VD), levando à disfunção progressiva do VD, podendo ser seguida de infarto (Lualdi and Goldhaber 1995; Smulders 2001; Konstantinides, Dias et al. 2006), o que geralmente pode levar o paciente a óbito.

Um método simples para avaliação da contratilidade cardíaca é a medida da chamada  $dP/dt$ . Em nosso estudo nos apropriamos desta medida para avaliar a função do ventrículo direito frente à embolia pulmonar aguda. Foram medidas a  $dP/dt$  max como índices de função sistólica do ventrículo direito. Observamos que a indução da EPA aumentou significativamente a  $dP/dt$  max quando comparada com os animais não embolizados e que o pré-tratamento com tempol (trinta minutos antes da indução da embolia) reduziu a  $dP/dt$  máx. Este menor aumento na  $dP/dt$  talvez seja atribuído a uma menor sobrecarga do ventrículo direito por conta do efeito vasodilatador. Possivelmente o efeito antioxidante do tempol tenha preservado o óxido nítrico endógeno pulmonar ocasionando uma vasodilatação e

consequentemente uma redução no índice de resistência conduzindo a uma redução na sobrecarga ventricular.

Estes resultados são apoiados pela literatura. Estudos mostraram que a administração de antioxidante (vitamina C) melhora a resposta contrátil a dobutamina e aumenta a eficiência do miocárdio em pacientes com falência cardíaca (Shinke, Shite et al. 2007). Embora tenhamos percebido em nossos achados uma diferença significativamente estatística, é possível que se aguardássemos por mais doze horas perceberíamos uma redução mais evidente na  $dP/dt$  na embolia pulmonar (Watts, Marchick et al. 2010).

Diretamente relacionada ao aumento da  $dP/dt$  máx, a indução da EPA aumentou de maneira significativa a concentração de troponina I cardíaca (TnIc) no soro dos animais embolizados quando comparada aos animais saudáveis. Ao passo que no soro dos animais pré-tratados e tratados com tempol não houve um aumento significativo na troponina I cardíaca.

De fato a troponina I cardíaca é um dos componentes protéicos do músculo estriado cardíaco que permite evidenciar uma lesão do miocárdio de forma altamente específica (Goldhaber 2003). Inúmeros trabalhos, tanto em modelo experimental quanto em estudos clínicos, tem mostrado um aumento na TnIc na embolia pulmonar (Konstantinides, Geibel et al. 2002; Horlander, Mannino et al. 2003; Kucher and Goldhaber 2003; Yalamanchili, Sukhija et al. 2004; Shokoohi, Shesser et al. 2009), inclusive com sua concentração sérica diretamente associada ao grau de hipertensão pulmonar (Uzuelli, Dias-Junior et al. 2008).

Tendo em vista os nossos resultados é possível cogitar que se a dosagem da TnIc fosse realizada muito mais tardiamente (como por exemplo, 4 a 6 horas após a

embolia) (Punukollu, Khan et al. 2005), possivelmente as diferenças seriam muito mais significativas entre os grupos. É possível que o tratamento com tempol poderia atenuar mais ainda os aumentos das concentrações de troponina I cardíaca no soro por proteger a função cardíaca do ventrículo direito durante a instalação da EPA. Isto é fortemente sugestivo levando em conta nossos achados. Tanto pelo método de zimografia em gel e zimografia *in situ* quanto por fluorimetria, a indução da EPA aumentou a atividade gelatinolítica das MMPs em amostras de ventrículo direito de carneiros. Tem sido descrito que MMPs -2 e -9 podem se localizar dentro dos cardiomiócitos e degradar proteínas contráteis a exemplo da troponina I cardíaca (TnIc) e a miosina de cadeia leve tipo 1 (MCL 1) (Rouet-Benzineb, Buhler et al. 1999; Chow, Cena et al. 2007; Schulz 2007). Isto sugere que, além de influenciar a hipertensão pulmonar induzida por EPA, as MMPs-2 e -9 também possam influenciar a função cardíaca, participando de alguma forma da disfunção do ventrículo direito em decorrência da EPA.

Visto que, o tratamento com tempol reduziu a atividade gelatinolítica nos diferentes ensaios realizados, é possível que o tempol diminua o estresse oxidativo no ventrículo direito, reduzindo a ativação das MMPs pelas espécies reativas de oxigênio, atenuando, por conseguinte, a degradação de proteínas contráteis (TnIc) no ventrículo direito resultando na proteção do miocárdio frente aos danos ocasionados pela embolia pulmonar aguda.

Contudo, não podemos desconsiderar como uma também provável explicação para atenuação dos níveis de troponina, a possibilidade do tempol agir diretamente sobre a hipertensão pulmonar. É possível que o tempol, desenvolvendo propriedades antioxidantes, reduza o estresse oxidativo na EPA, aumentando a

biodisponibilidade do óxido nítrico endógeno na circulação pulmonar, conduzindo a vasodilatação e acomodação do fluxo sanguíneo, o que contribui para menor aumento na pressão média da artéria pulmonar, menor aumento do trabalho e sofrimento do ventrículo direito e, conseqüentemente, menor aumento na concentração de troponina I cardíaca.

Entretanto, é provável ainda que ambas as possibilidades: o tempol atuando indiretamente sobre as MMPs ou o tempol atuando diretamente sobre a hipertensão pulmonar, expliquem nossos achados experimentais. Trata-se de uma limitação do nosso estudo saber a partir dos resultados obtidos neste experimento se nossos achados se explicam pela primeira, segunda ou as duas possibilidades. Seriam necessários outros estudos para alcançarmos esta conclusão.

## ***7. Conclusão***

---

Nossos resultados permitem concluir que o tempol atenua as alterações hemodinâmicas observadas durante a EPA, além de atenuar o aumento de atividade de MMPs no ventrículo direito, o que pode se traduzir em efeito protetor contra a lesão ventricular associada aos aumentos de troponina I cardíaca.

## **8. Referências Bibliográficas**

- Alpert, J. S., K. Thygesen, et al. (2000). "Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **36**(3): 959-69.
- Amalinei, C., I. D. Caruntu, et al. (2007). "Biology of metalloproteinases." Rom J Morphol Embryol **48**(4): 323-34.
- Baicu, C. F., J. D. Stroud, et al. (2003). "Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(1): H122-32.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-37.
- Bogaard, H.J., Abe, et al. (2009). "The right ventricle under pressure cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension". Chest **135**:794-804.
- Bowers, R., C. Cool, et al. (2004). "Oxidative stress in severe pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **169**(6): 764-9.
- Brennan, L. A., R. H. Steinhorn, et al. (2003). "Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase." Circ Res **92**(6): 683-91.
- Cai, H. and D. G. Harrison (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-4.
- Carson, J. L., M. A. Kelley, et al. (1992). "The clinical course of pulmonary embolism." N Engl J Med **326**(19): 1240-5.
- Chow, A. K., J. Cena, et al. (2007). "Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature." Br J Pharmacol **152**(2): 189-205.
- Coker, M. L., M. A. Doscher, et al. (1999). "Matrix metalloproteinase synthesis and expression in isolated LV myocyte preparations." Am J Physiol **277**(2 Pt 2): H777-87.
- Dantzker, D. R., P. D. Wagner, et al. (1978). "Gas exchange after pulmonary thromboembolization in dogs." Circ Res **42**(1): 92-103.
- DATASUS [sítio na Internet]. Brasília (DF): Datasus; c2003. [citado 2005 Out10]. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br/cgi/sih/mimap.htm>
- DeMarco, V. G., J. Habibi, et al. (2008). "Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)27 rat." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(6): H2659-68.
- Deryugina, E. I. and J. P. Quigley (2006). "Matrix metalloproteinases and tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **25**(1): 9-34.
- Dias-Junior, C. A., M. F. Montenegro, et al. (2008). "Sildenafil improves the beneficial haemodynamic effects of intravenous nitrite infusion during acute pulmonary embolism." Basic Clin Pharmacol Toxicol **103**(4): 374-9.
- Dias-Junior, C. A., D. C. Souza-Costa, et al. (2005). "The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension." Anesth Analg **101**(1): 115-20, table of contents.
- Dikshit, M., R. Srivastava, et al. (1989). "Role of free radicals in pulmonary thromboembolism in mice." Thromb Res **55**(5): 549-57.

- Dismuke, S. E. and E. H. Wagner (1986). "Pulmonary embolism as a cause of death. The changing mortality in hospitalized patients." JAMA **255**(15): 2039-42.
- Dutta, U. K., J. Lane, et al. (2006). "Superoxide formation and interaction with nitric oxide modulate systemic arterial pressure and renal function in salt-depleted dogs." Exp Biol Med (Maywood) **231**(3): 269-76.
- Eagleton, M. J., P. K. Henke, et al. (2002). "Southern Association for Vascular Surgery William J. von Leibig Award. Inflammation and intimal hyperplasia associated with experimental pulmonary embolism." J Vasc Surg **36**(3): 581-8.
- Elliot, C. G. Pulmonary physiology during pulmonary embolism. *Chest*, v.101, p.163S-171S. 1992.
- Elmedal, B., M. Y. de Dam, et al. (2004). "The superoxide dismutase mimetic, tempol, blunts right ventricular hypertrophy in chronic hypoxic rats." Br J Pharmacol **141**(1): 105-13.
- Fegler, G. (1954). "Measurement of cardiac output in anaesthetized animals by a thermodilution method." Q J Exp Physiol Cogn Med Sci **39**(3): 153-64.
- Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, et al. (1999). "Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor." Circ Res **85**(10): 906-11.
- Fernandez-Patron, C., K. G. Stewart, et al. (2000). "Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction." Circ Res **87**(8): 670-6.
- Fernandez-Patron, C., C. Zouki, et al. (2001). "Matrix metalloproteinases regulate neutrophil-endothelial cell adhesion through generation of endothelin-1[1-32]." FASEB J **15**(12): 2230-40.
- Fortuna, G. M., L. Figueiredo-Lopes, et al. (2007). "A role for matrix metalloproteinase-9 in the hemodynamic changes following acute pulmonary embolism." Int J Cardiol **114**(1): 22-7.
- Galis, Z. S., G. K. Sukhova, et al. (1995). "Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue." FASEB J **9**(10): 974-80.
- Gerlach, R. F., J. A. Uzuelli, et al. (2005). "Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities." Anal Biochem **344**(1): 147-9.
- Goldhaber, S. Z. (2003). "Cardiac biomarkers in pulmonary embolism." Chest **123**(6): 1782-4.
- Goldhaber, S. Z., L. Visani, et al. (1999). "Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER)." Lancet **353**(9162): 1386-9.
- Golin, V., S. R. Sprovieri, et al. (2002). "Pulmonary thromboembolism: retrospective study of necropsies performed over 24 years in a university hospital in Brazil." Sao Paulo Med J **120**(4): 105-8.
- Griendling, K. K. and G. A. FitzGerald (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS." Circulation **108**(16): 1912-6.
- Hao, L., T. Nishimura, et al. (2006). "Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 819-25.

- Heymans, S., A. Luttun, et al. (1999). "Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure." Nat Med **5**(10): 1135-42.
- Hodyc, D., M. Snorek, et al. (2007). "Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production." Exp Physiol **92**(5): 945-51.
- Horlander, K. T., D. M. Mannino, et al. (2003). "Pulmonary embolism mortality in the United States, 1979-1998: an analysis using multiple-cause mortality data." Arch Intern Med **163**(14): 1711-7.
- Kim, H. E., S. S. Dalal, et al. (2000). "Disruption of the myocardial extracellular matrix leads to cardiac dysfunction." J Clin Invest **106**(7): 857-66.
- Knock, G. A., V. A. Snetkov, et al. (2009). "Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca(2+) sensitization." Free Radic Biol Med **46**(5): 633-42.
- Konstantinides, S., A. Geibel, et al. (2002). "Importance of cardiac troponins I and T in risk stratification of patients with acute pulmonary embolism." Circulation **106**(10): 1263-8.
- Krishna, M. C., D. A. Grahame, et al. (1992). "Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5537-41.
- Kucher, N. and S. Z. Goldhaber (2003). "Cardiac biomarkers for risk stratification of patients with acute pulmonary embolism." Circulation **108**(18): 2191-4.
- Kumari, R., M. Dikshit, et al. (1993). "Free radical scavenging mechanisms during pulmonary thromboembolism in rats." Thromb Res **69**(1): 101-11.
- Lalu, M. M., J. Cena, et al. (2006). "Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction." Br J Pharmacol **149**(1): 31-42.
- Leonardo, C. C. and K. R. Pennypacker (2009). "Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury." J Neuroinflammation **6**: 13.
- Li, H., T. Wallerath, et al. (2002). "Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs." Nitric Oxide **7**(3): 149-64.
- Liu, J. Q., I. N. Zelko, et al. (2006). "Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox)." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(1): L2-10.
- Lualdi, J. C. and S. Z. Goldhaber (1995). "Right ventricular dysfunction after acute pulmonary embolism: pathophysiologic factors, detection, and therapeutic implications." Am Heart J **130**(6): 1276-82.
- Majid, D. S., A. Nishiyama, et al. (2005). "Superoxide scavenging attenuates renal responses to ANG II during nitric oxide synthase inhibition in anesthetized dogs." Am J Physiol Renal Physiol **288**(2): F412-9.
- Martinez, A., H. R. Oh, et al. (2004). "Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator." Biochem J **383**(Pt. 3): 413-8.

- Mesquita, C. T., J. L. Morandi Junior, et al. (1999). "Fatal pulmonary embolism in hospitalized patients. Clinical diagnosis versus pathological confirmation." Arg Bras Cardiol **73**(3): 255-258.
- Muhl, D., R. Furedi, et al. (2006). "Evaluation of oxidative stress in the thrombolysis of pulmonary embolism." J Thromb Thrombolysis **22**(3): 221-8.
- Nilsson, U. A., L. I. Olsson, et al. (1989). "Inhibition of lipid peroxidation by spin labels. Relationships between structure and function." J Biol Chem **264**(19): 11131-5.
- O'Connor, C. M. and M. X. FitzGerald (1994). "Matrix metalloproteases and lung disease." Thorax **49**(6): 602-9.
- Okamoto, T., T. Akaike, et al. (2001). "Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation." J Biol Chem **276**(31): 29596-602.
- Palei, A. C., R. A. Zaneti, et al. (2005). "Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism." Angiology **56**(5): 611-7.
- Punukollu, G., I. A. Khan, et al. (2005). "Cardiac troponin I release in acute pulmonary embolism in relation to the duration of symptoms." Int J Cardiol **99**(2): 207-11.
- Reeves, J. T. and L. J. Rubin (1998). "The pulmonary circulation: snapshots of progress." Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 2): S101-8.
- Riedel, M. (2001). "Acute pulmonary embolism 1: pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis." Heart **85**(2): 229-40.
- Riedel, M. (2001). "Acute pulmonary embolism 2: treatment." Heart **85**(3): 351-60.
- Rosenberg, G. A. (2009). "Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases." Lancet Neurol **8**(2): 205-16.
- Rouet-Benzineb, P., J. M. Buhler, et al. (1999). "Altered balance between matrix gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their tissue inhibitors in human dilated cardiomyopathy: potential role of MMP-9 in myosin-heavy chain degradation." Eur J Heart Fail **1**(4): 337-52.
- Roy, R., B. Zhang, et al. (2006). "Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis." Exp Cell Res **312**(5): 608-22.
- Sadosty, A. T., E. T. Boie, et al. (2003). "Pulmonary embolism." Emerg Med Clin North Am **21**(2): 363-84.
- Sainz, J., R. Wangenstein, et al. (2005). "Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition." Am J Hypertens **18**(6): 871-7.
- Schulz, R. (2007). "Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 211-42.
- Shimizu, Y., N. Nagaya, et al. (2002). "Serum uric acid level increases in proportion to the severity of pulmonary thromboembolism." Circ J **66**(6): 571-5.
- Shinke, T., J. Shite, et al. (2007). "Vitamin C restores the contractile response to dobutamine and improves myocardial efficiency in patients with heart failure after anterior myocardial infarction." Am Heart J **154**(4): 645 e1-8.
- Shokoji, T., A. Nishiyama, et al. (2003). "Renal sympathetic nerve responses to tempol in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **41**(2): 266-73.

- Shokoohi, H., R. Shesser, et al. (2009). "The correlation between elevated cardiac troponin I and pulmonary artery obstruction index in ED patients with pulmonary embolism." Am J Emerg Med **27**(4): 449-53.
- Simonsen, U., F. H. Christensen, et al. (2009). "The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure." Pharmacol Ther **122**(2): 109-24.
- Smulders, Y. M. (2001). "Contribution of pulmonary vasoconstriction to haemodynamic instability after acute pulmonary embolism. Implications for treatment?" Neth J Med **58**(6): 241-7.
- Souza-Costa, D. C., L. Figueiredo-Lopes, et al. (2007). "Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9." Crit Care Med **35**(1): 239-45.
- Souza-Costa, D. C., T. Zerbini, et al. (2005). "L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9." Chest **128**: 3705-3710.
- Souza-Silva, A. R., C. A. Dias-Junior, et al. (2005). "Hemodynamic effects of combined sildenafil and L-arginine during acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension." Eur J Pharmacol **524**(1-3): 126-31.
- Souza-Tarla, C. D., J. A. Uzuelli, et al. (2005). "Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities." Clin Biochem **38**(5): 410-4.
- Stratmann, G. and G. A. Gregory (2003). "Neurogenic and humoral vasoconstriction in acute pulmonary thromboembolism." Anesth Analg **97**(2): 341-54.
- Tuder RM, Cool C, Jennings C, Voelkel NF. Pulmonary vascular involvement in interstitial lung disease. In: Schwarz MI, King Jr TE, eds. Interstitial Lung Disease. 3 ed. Hamilton: BC Decker Inc.; 1998. p.251-63.
- Tanus-Santos, J. E. and H. Moreno, Jr. (2001). "Is there a place for inhaled nitric oxide in the therapy of massive pulmonary embolism?" Anesthesiology **94**(2): 354.
- Thiemermann, C. (2003). "Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation." Crit Care Med **31**(1 Suppl): S76-84.
- Thompson, J. S., R. D. Jones, et al. (1998). "Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat pulmonary arteries by diphenyleneiodonium (DPI)." Pulm Pharmacol Ther **11**(1): 71-5.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol **122**(4): 339-52.
- Tyagi, S. C., L. Matsubara, et al. (1993). "Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus." Clin Biochem **26**(3): 191-8.
- Uzuelli, J. A., C. A. Dias-Junior, et al. (2008). "Severity dependent increases in circulating cardiac troponin I and MMP-9 concentrations after experimental acute pulmonary thromboembolism." Clin Chim Acta **388**(1-2): 184-8.
- Viel, E. C., K. Benkirane, et al. (2008). "Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(1): H281-8.

- Voelkel, N. F. and R. M. Tuder (2000). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease?" J Clin Invest **106**(6): 733-8.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes Dev **14**(17): 2123-33.
- Wang, W., C. J. Schulze, et al. (2002). "Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury." Circulation **106**(12): 1543-9.
- Watts, J. A., M. R. Marchick, et al. (2010). "Right ventricular heart failure from pulmonary embolism: key distinctions from chronic pulmonary hypertension." J Card Fail **16**(3): 250-9.
- Waypa, G. B., N. S. Chandel, et al. (2001). "Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing." Circ Res **88**(12): 1259-66.
- Weinmann, E. E. and E. W. Salzman (1994). "Deep-vein thrombosis." N Engl J Med **331**(24): 1630-41.
- West, J. B. *Fisiologia Respiratória Moderna*. San Diego: Editora Manole LTDA. 1977. 175 p.
- Wilcox, C. S. and A. Pearlman (2008). "Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides." Pharmacol Rev **60**(4): 418-69.
- Wood, K. E. (2002). "Major pulmonary embolism: review of a pathophysiologic approach to the golden hour of hemodynamically significant pulmonary embolism." Chest **121**(3): 877-905.
- Yalamanchili, K., R. Sukhija, et al. (2004). "Prevalence of increased cardiac troponin I levels in patients with and without acute pulmonary embolism and relation of increased cardiac troponin I levels with in-hospital mortality in patients with acute pulmonary embolism." Am J Cardiol **93**(2): 263-4.
- Zimmet, J. M. and J. M. Hare (2006). "Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system." Circulation **114**(14): 1531-44.

## ***9. Apêndice***

Tabela 1 - Valor da Pressão média da artéria pulmonar em mmHg (PMAP)											
GRUPO	BL	T15	T30	E15	E30	E45	E60	E75	E90	E105	E120
SHAM	18±1	18±1	18±1	17±1	17±1	18±1	18±1	17±1	17±1	17±1	17±1
EPA	15±1	15±1	15±1	# 37±2	# 37±2	# 37±2	# 37±1	# 35±1	# 35±1	# 35±2	# 35±2
TEMPOL+EPA	16±2	16±2	17±2	* 28±3	* 27±2	* 27±2	* 27±2	* 26±2	* 26±2	* 26±2	* 26±2
EPA+TEMPOL	12±1	13±1	12±1	35±2	35±2	** 31±2	** 30±2	** 30±2	** 29±2	** 28±2	** 29±2

**Grupo EPA vs Sham (#p<0,05); Grupo Tempol+EPA vs EPA (\*p<0,05)**

**Grupo EPA+Tempol vs EPA (\*\*p<0,05). Média ± erro padrão**

Tabela 2 - Valor do Índice de Resistência Vascular Pulmonar em dina.s.cm <sup>-5</sup> .m <sup>-2</sup> (IRVP)											
GRUPO	BL	T15	T30	E15	E30	E45	E60	E75	E90	E105	E120
SHAM	299±34	297±25	321±34	322±34	339±29	342±34	342±32	332±20	305±21	288±15	278±16
EPA	211±21	207±19	206±20	# 558±46	# 547±45	# 538±48	# 538±47	# 479±42	# 485±41	# 464±31	# 483±31
TEMPOL+EPA	275±49	287±54	284±43	426±51	418±57	449±66	474±59	440±53	423±51	412±55	397±54
EPA+TEMPOL	158±23	162±21	153±24	469±41	488±44	455±52	457±53	436±50	430±47	421±44	432±46

**Grupo EPA vs Sham (#p<0,05). Média ± erro padrão**

Tabela 3 - Valor da pressão arterial média em mmHg (PAM)											
GRUPO	BL	T15	T30	E15	E30	E45	E60	E75	E90	E105	E120
SHAM	100±4	99±4	98±5	97±5	97±4	98±3	99±3	99±3	99±3	101±3	101±3
EPA	99±3	100±3	100±4	104±4	103±5	103±5	104±5	102±5	101±5	100±6	100±5
TEMPOL+EPA	102±3	101±3	101±3	106±1	103±2	101±3	104±3	101±3	98±4	98±4	98±3
EPA+TEMPOL	97±2	98±2	96±3	102±9	101±3	93±3	91±5	90±5	86±7	84±8	82±9

Tabela 4 - Valor do Índice de Resistência Vascular sistêmico em dina.s.cm <sup>-5</sup> .m <sup>-2</sup> (IRVS)											
GRUPO	BL	T15	T30	E15	E30	E45	E60	E75	E90	E105	E120
SHAM	2129±120	2025±85	2047±35	2075±54	2142±141	2103±96	2118±43	2138±50	2068±107	2033±91	2102±93
EPA	1849±133	1821±115	1848±122	1738±160	1701±154	1629±140	1652±142	1525±119	1556±118	1473±102	1546±94
TEMPOL+EPA	2191±214	2186±255	2153±174	1944±176	1877±184	1926±259	2007±231	1853±191	1739±152	1675±188	1611±185
EPA+TEMPOL	1765±143	1790±151	1705±145	1479±84	1521±114	1502±158	1478±171	1476±186	1409±170	1406±192	1397±206

Tabela 5 - Valor da frequência cardíaca em batimentos por minuto (FC)											
GRUPO	BL	T15	T30	E15	E30	E45	E60	E75	E90	E105	E120
SHAM	105±10	101±9	98±9	95±8	93±8	90±7	88±7	89±6	91±7	94±7	95±8
EPA	112±6	114±6	113±6	# 156±10	# 161±11	# 166±11	# 169±12	# 172±12	# 173±12	# 178±11	# 180±11
TEMPOL+EPA	94±3	94±2	95±3	* 111±9	* 110±7	* 113±8	* 117±8	* 118±7	* 116±8	* 122±9	* 131±11
EPA+TEMPOL	117±9	124±9	126±8	181±14	187±14	174±13	170±13	170±12	167±13	171±14	167±13

**Grupo EPA vs Sham (#p<0,05); Grupo Tempol+EPA vs EPA (\*p<0,05). Média ± erro padrão**

Tabela 6 - Valor do índice cardíaco em l/min <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> (IC)											
GRUPO	BL	T15	T30	E15	E30	E45	E60	E75	E90	E105	E120
SHAM	3,6±0,1	3,7±0,2	3,7±0,3	3,6±0,2	3,4±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	3,5±0,1	3,6±0,2	3,7±0,1	3,6±0,2
EPA	4,3±0,2	4,3±0,2	3,9±0,2	4,2±0,3	4,3±0,4	4,6±0,4	4,7±0,4	4,9±0,3	4,9±0,3	4,9±0,2	4,5±0,2
TEMPOL+EPA	3,8±0,4	3,8±0,4	3,7±0,3	4,4±0,4	4,5±0,4	4,4±0,5	4,3±0,6	4,5±0,5	4,5±0,4	4,7±0,5	5,0±0,6
EPA+TEMPOL	4,4±0,3	4,4±0,3	4,5±0,4	5,5±0,3	5,3±0,4	5,0±0,4	5,0±0,5	5,0±0,5	4,9±0,4	4,7±0,3	4,7±0,3

Tabela 7 - Valor da variação da pressão sistólica do ventrículo direito em função do tempo em mmHg/s (dP/dt max)											
GRUPO	BL	T15	T30	E15	E30	E45	E60	E75	E90	E105	E120
SHAM	641±65	625±64	603±55	572±52	580±61	565±51	557±46	542±40	557±34	572±44	542±40
EPA	605±34	588±32	596±33	# 982±82	# 1057±92	# 1115±94	# 1090±86	# 1096±86	# 1127±87	# 1143±93	# 1096±77
TEMPOL+EPA	553±45	549±36	575±31	* 737±53	* 750±51	* 745±62	* 771±80	* 811±62	* 806±81	* 824±83	* 876±88
EPA+TEMPOL	603±47	629±49	618±107	1175±304	1259±99	1053±111	1060±116	1106±119	1026±108	1034±102	965±93

**Grupo EPA vs Sham (#p<0,05); Grupo Tempol+EPA vs EPA (\*p<0,05). Média ± erro padrão**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)