

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**LUIZ ALBERTO FERREIRA RAMOS**

**“EFEITO DA MELATONINA SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM  
RATOS PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR  
MONOCROTALINA”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
LUIZ ALBERTO FERREIRA  
RAMOS  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Molecular e  
Funcional, na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Miguel Areas".

**Campinas, Fevereiro 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

R147e	<p>Ramos, Luiz Alberto Ferreira Efeito da melatonina sobre parâmetros cardiovasculares em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina / Luiz Alberto Ferreira Ramos. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Miguel Arcanjo Areas. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Monocrotalina. 2. Melatonina. 3. Eletrocardiografia. 4. Ratos Wistar. 5. Hipertensão pulmonar. I. Areas, Miguel Arcanjo, 1952-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
-------	--

**Título em inglês:** Melatonin effect on cardiovascular parameters in disabled pulmonary arterial hypertension monocrotaline induced rats.

**Palavras-chave em inglês:** Monocrotalin; Melatonin; Electrocardiography; Wister rats; Pulmonary hypertension.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Miguel Arcanjo Areas, Dora Maria Grassi-Kassisse, Felix Guillermo Reyes Reyes.

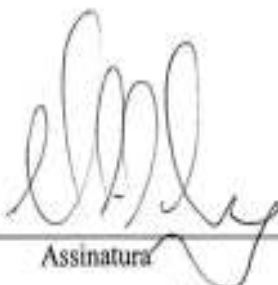
**Data da defesa:** 23/02/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 23 de Fevereiro de 2010

## BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Miguel Arcanjo Áreas (Orientador)**



---

Assinatura

**Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse**



---

Assinatura

**Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes**



---

Assinatura

**Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro**

---

Assinatura

**Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior**

---

Assinatura

**Dedicatória:**

Dedico este trabalho a meus pais, Luiz Ramos (in memoriam) e Joana D'arc., por proporcionarem condições para minha formação pessoal, profissional e intelectual, não medindo esforços para a realização das minhas aspirações.

Dedico a minha irmã Ana Lúcia pelo apoio incondicional nos momentos turbulentos, sempre com palavras positivas, orações e incentivos, amiga incansável, parceira em todas as conquistas, minha mentora intelectual.

E, por fim, dedico ao meu sobrinho Francis Grace pelo apoio nos momentos em que necessitei de um amigo para conversar, pelo pai dedicado, auxiliando-me nos momentos difíceis.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, por me proporcionar saúde, força e determinação para atingir meus objetivos, superação para contornar os diversos obstáculos impostos pela vida, podendo, assim, reestruturar e renovar os objetivos.

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas, meu orientador, a quem admiro e respeito. Referência como docente, inteligência, sabedoria ímpar. Agradeço por todo incentivo, confiança e dedicação ao exercício do ensino. Pelos momentos de descontração, pelos constantes questionamentos, os quais fortaleceram nossa opção de vida. Agradeço por possibilitar a realização de um sonho.

A Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse pela amizade, confiança e por proporcionar condições para a realização da minha pesquisa, assim como sugestões pertinentes ao meu trabalho que me auxiliaram muito na elaboração da minha dissertação.

A Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes pelas orientações durante meu estágio docente (PED) e pelo apoio nos momentos em que utilizei o Laboratório. Educadora incansável, pesquisadora de extrema habilidade.

Aos meus amigos de Laboratório Fernanda, Brígida, Gustavo, Clodoaldo, Chico e Marcelo, que colaboraram no desenvolvimento da minha pesquisa.

Aos meus amigos do Departamento de Fisiologia, Amon, Thiago, Marise, Tim, Marcela, Larissa, Débora, Danny, Heloísa, Elayne, Emiliane, Rebeca, Amarilys, Carol (Babalú), Estela, Heder Frank e aos demais alunos dos laboratórios do Depto. de Fisiologia.

Aos meus amigos da FAEFI, Rubens Vicente Seixas (Bica) e Robson Aparecido Mazzocato (Barba), pela amizade incondicional e pelos momentos de companheirismo.

As minhas amigas Rosa Alexandra (Depto. de Fisiologia e Biofísica), Andréia, Silvia e Rafael (Secretaria de Pós-graduação) pelo apoio durante a fase de seleção, sempre com palavras de incentivo.

Ao Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia – UNICAMP.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no desenvolvimento desta pesquisa.

## Índice

<b>Resumo</b>	Pág. 07
<b>Abstract</b>	Pág. 09
<b>Lista de Abreviaturas</b>	Pág. 11
<b>Lista de Tabelas e Figuras</b>	Pág. 13
<b>1. Introdução</b>	Pag. 17
<b>2. Objetivos</b>	Pag. 25
<b>3. Materiais e Métodos</b>	Pág. 26
3.1. Animais	Pág. 26
3.2. Grupos experimentais	Pág. 26
3.3. Reatividade Vascular	Pág. 27
3.3.1. Obtenção de anéis vasculares	Pág. 27
3.3.2. Preparação de anéis vasculares	Pág. 27
3.3.3. Procedimento experimental	Pág. 28
3.3.4. Obtenção da curva concentração-efeito	Pág. 28
3.4. Parâmetros eletrocardiográficos	Pág. 28
3.5. Pressão arterial	Pág. 29
3.6. Parâmetros morfológicos	Pág. 29
3.7. Análise estatística	Pág. 30
<b>4. Resultados e Discussão</b>	Pág. 30
4.1. Reatividade Vascular	Pág. 30
4.2. Parâmetros eletrocardiográficos (ECG)	Pág. 32
4.3. Pressão arterial média	Pág. 40
4.4. Histologia cardíaca	Pág. 42
4.5. Histologia Pulmonar	Pág. 47
<b>5. Conclusão</b>	Pág. 50
<b>6. Perspectivas</b>	Pág. 50
<b>7. Referências bibliográficas</b>	Pág. 52

## Resumo

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma patologia caracterizada pelo aumento da resistência dos vasos pulmonares, aumento na pressão arterial pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito, prejudicando as trocas gasosas alveolares e a função cardíaca. Por outro lado, a melatonina (N-Acetil-5-metoxitriptamina), o principal hormônio produzido pela glândula pineal, pode reduzir o tônus do músculo liso vascular promovendo redução da resistência periférica e, conseqüentemente, diminuição da pressão arterial em ratos hipertensos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da melatonina sobre parâmetros cardiovasculares de ratos portadores de HAP induzida por monocrotalina. Ratos Wistar adultos pesando com 250g foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=5): CO (controle); CML (controle melatonina); MT (monocrotalina); MTML (monocrotalina+melatonina). A HAP foi induzida pela administração de dose única de monocrotalina (60 mg/kg i.p.) no primeiro dia de experimento. Melatonina (15 mg/kg i.p.) foi administrada diariamente, durante os 28 dias do período experimental. Os animais foram anestesiados (ketamina 100 mg/kg + xilazina 7 mg/kg de peso corpóreo i.m.) para a obtenção de parâmetros eletrocardiográficos e avaliação da pressão arterial e, posteriormente foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico, para o estudo da reatividade vascular e para análise histológica do coração e pulmões. Os resultados mostraram que melatonina reduziu significativamente a resposta contrátil da artéria pulmonar em relação aos ratos controles e portadores de HAP para resposta máxima da reatividade vascular à noradrenalina. A análise histológica mostrou que a melatonina aumentou significativamente a área do lúmen das artérias pré-acinares pulmonares e a área alveolar do grupo MTML, em relação ao grupo MT, o qual apresentou valores significativamente reduzidos, em relação ao grupo CO. Além disso, a melatonina proporcionou nos animais tratados com monocrotalina menor desvio do eixo elétrico para a direita em conseqüência, provavelmente, do menor grau de hipertrofia ventricular direita o que acarretou em redução do intervalo QT e, conseqüentemente, na prevenção do risco de morte súbita decorrente das alterações cardíacas desencadeadas pela



hipertensão arterial pulmonar. Melatonina, também, preveniu a redução da pressão arterial média nos animais cuja oxigenação tecidual encontrava-se, provavelmente, prejudicada pelas alterações pulmonares e cardíacas induzidas pela monocrotalina. Concluindo, melatonina atenuou os efeitos deletérios da monocrotalina sobre parâmetros cardiovasculares e pulmonares neste modelo de hipertensão arterial pulmonar.

**Palavras-chave:** Melatonina, hipertensão arterial pulmonar, monocrotalina, eletrocardiograma, Ratos Wistar.

**Abstract**

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease characterized by increased pulmonary vascular resistance, increased pulmonary arterial pressure and right ventricular hypertrophy and impairs alveolar gas exchange and cardiac function. Moreover, melatonin (N-acetyl-5-metoxytryptamine), the main hormone produced by the pineal gland can reduce the tone of vascular smooth muscle was a reduction in peripheral resistance and thus lowering blood pressure in hypertensive rats. The objective of this study was to evaluate the effect of melatonin on cardiovascular parameters of rats with monocrotaline-induced PAH. Male Wistar rats weighing 250g were divided into four experimental groups (n = 5): CO (control), CML (control melatonin), MT (monocrotaline), MTML (monocrotaline + melatonin). PAH was induced by administration of single dose of monocrotaline (60 mg / kg ip) on the first day of the experiment. Melatonin (15 mg / kg ip) was administered daily for 28 days trial period. The animals were anesthetized (Ketamine 100 mg / kg + xylazine 7 mg / kg body weight im) to obtain electrocardiographic parameters and blood pressure evaluation and later euthanized by deep anesthesia, to study the vascular reactivity and for histological analysis of the heart and lungs. The results showed that melatonin significantly reduced the contractile response of pulmonary artery and control rats with PAH for maximum response of vascular reactivity to norepinephrine. Histological analysis showed that melatonin significantly increased the lumen area of the pre-acinar pulmonary alveolar area and the group's HTML, for the TM group, which had significantly reduced compared to the CO group. Moreover, melatonin delivered in animals treated with monocrotaline minor electrical axis deviation to the right as a result, probably the lowest degree of right ventricular hypertrophy which resulted in a reduction of the QT interval and thus to prevent the risk of sudden death due of cardiac abnormalities triggered by pulmonary arterial hypertension. Melatonin also prevented the reduction in mean arterial pressure in animals in which tissue oxygenation was, probably affected by changes in pulmonary and cardiac changes induced by monocrotaline. In conclusion, melatonin attenuated the deleterious effects of monocrotaline on cardiovascular parameters in this model of pulmonary

arterial

hypertension.

**Keywords:** Melatonin, pulmonary arterial hypertension, monocrotaline, electrocardiogram, Wistar rats.

### Lista de Abreviaturas

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BMPR2</b>	Receptor 2 da proteína morfogenética óssea
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	íon Cálcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Cálcio
<b>CCE</b>	Curva de concentração-efeito
<b>CML</b>	Rato controle melatonina
<b>CO</b>	Rato controle
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma
<b>EDHF</b>	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
<b>eNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase endotelial
<b>ET-1</b>	Endotelina do tipo 1
<b>GABA</b>	Ácido Gama Amino Butírico
<b>HAP</b>	Hipertensão arterial pulmonar
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>KCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potássio
<b>MEL</b>	Melatonina
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Magnésio
<b>MCT</b>	Monocrotalina
<b>MCTP</b>	Monocrotalina pyrrole

<b>MT</b>	Rato portador de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina
<b>MTML</b>	Rato portador de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina + melatonina
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>Na<sup>+</sup></b>	Íon sódio
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de Sódio
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>SNC</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>TGF-β</b>	Fator transformador do crescimento β
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular

## Lista de tabela e figuras

**Figura 1.** Curva de concentração-efeito para noradrenalina sobre melatonina.

Pág. 22

**Figura 2.** Freqüência Cardíaca dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (CO) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) pelo período de 28 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) CO X CML, (b) CO X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; ( $n = 5$ ).

Pág. 28

**Figura 3.** Amplitude da onda P dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (CO) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) durante 28 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) C X CML, (b) C X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; ( $n = 5$ ).

Pág. 29

**Figura 4.** Intervalo QRS dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (CO) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) durante o período de 30 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) CO X CML, (b) CO X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; ( $n = 5$ ).

Pág. 30

**Figura 5.** Intervalo QT dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (CO) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) pelo período de 28 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) CO X CML, (b) CO X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; ( $n = 5$ ).

Pág. 31

**Figura 6.** Pressão arterial média dos animais dos grupos controle (CO); grupo controle tratado com melatonina (CML); grupo tratado com monocrotalina (MT); grupo tratado com monocrotalina + melatonina (MTML), ao final do período experimental. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para: (a) CO X CML; (b) CO X MT; (c) MT X MTML; (ns) não significativo;  $n = 4$ .

Pág. 33

**Figura 7.** Fotomicrografia de artéria cardíaca de ratos dos grupos controle (CO) e do grupo controle melatonina (CML). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente; túnica média e camada adventícia sem espessamento. HE. objetiva 40 X.

Pág. 34

**Figura 8.** Fotomicrografia de artéria cardíaca de ratos dos grupos monocrotalina (MT) e monocrotalina+melatonina (MTML) portadores de HAP. Observam-se espessamento da adventícia, diminuição do lúmen vascular com obliteração e infiltrações leucocitárias (MT) núcleos íntegros dispostos periféricamente e lúmen vascular íntegro (MTML). HE. Objetiva 40 X.

Pág. 36

**Figura 9.** Fotomicrografia de artéria pulmonar (A) grupo controle (CO) apresenta artéria com área interna de  $18.284 \mu\text{m}^2$ , núcleos celulares normais, espessura da

túnica média íntegra; **(B)** grupo monocrotalina (MT) (60 mg/Kg de peso corpóreo), apresenta artéria espessamento da túnica média com área interna de  $11.216 \mu\text{m}^2$ , hipertrofia nuclear (seta preta) e diminuição do lúmen vascular; **(C)** grupo controle melatonina (CML) apresenta artéria com área interna de  $58.534 \mu\text{m}^2$  túnica média íntegra, preservação do lúmen vascular; **(D)** grupo monocrotalina+melatonina (MTML) (60 mg/Kg de peso corpóreo, dose única) + (15 mg/Kg de peso corpóreo, dose diária/28 dias), apresenta artéria com área interna de  $24.509 \mu\text{m}^2$ , diminuição do espessamento da túnica média e aumento do diâmetro do lúmen vascular; H.E. Objetiva 40x (n=5)

Pág. 37

**Figura 10.** Fotomicrografia do parênquima pulmonar **(A)** grupo controle (CO) apresenta área alveolar de  $501.453 \mu\text{m}^2$ , ducto alveolar, tecido extra-alveolar e alvéolos íntegros; **(B)** grupo monocrotalina (MT) (60 mg/Kg de peso corpóreo), apresenta área alveolar de  $424.199 \mu\text{m}^2$ , espessamento do tecido alveolar, hipertrofia nuclear, infiltração leucocitária; **(C)** grupo controle melatonina (CML) apresenta área alveolar de  $938.940 \mu\text{m}^2$ , tecido alveolar íntegro; **(D)** grupo monocrotalina+melatonina (MTML) (60 mg/Kg de peso corpóreo, dose única) + (15 mg/Kg de peso corpóreo, dose diária/28 dias), apresenta área alveolar de  $625.354 \mu\text{m}^2$  diminuição do espessamento do parênquima e aumento do diâmetro do lúmen vascular; H.E. Objetiva 20x (n=5)

**Tabela 1.** Valores pD2 e Rmáx das CCE, apresentados como média  $\pm$  EPM referentes ao tratamento com melatonina (MEL) em anéis de artéria pulmonar com endotélio dos grupos controle+noradrenalina (CO NA) (○), monocrotalina+noradrenalina (MT NA) (●), controle melatonina+noradrenalina (CML NA) (□) e (monocrotalina-melatonina + noradrenalina (MTML NA) (■). Análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para: (a) CO NA ( $0,305 \pm 0,007$ ) vs MT NA ( $0,183 \pm 0,010$ ) (\*), (b) CO NA ( $0,305 \pm 0,007$ ) vs MTML NA ( $0,160 \pm 0,023$ ) (\*), (c) MT NA ( $0,183 \pm 0,010$ ) vs MTML NA ( $0,160 \pm 0,023$ ) (ns); n = 3. (\*) significativo ( $p < 0,05$ ) e (ns) não significativo.

Pág. 23



**Tabela 2.** Mensuração da artéria coronária dos ratos dos grupos controle (CO), portadores de HAP (MT), controle melatonina (CML) e portadores de HAP tratados com melatonina (MTML) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey; ( $p < 0,05$ ) (\*): CO x CML; C X MT e MT x MTML; (n = 6).

Pág. 41

**Tabela 3.** Medidas da artéria pré-acinar pulmonar dos ratos dos grupos controle (CO), portadores de HAP (MT), controle melatonina (CML) e portadores de HAP tratados com melatonina (MTML) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey; ( $p < 0,05$ ) (\*): CO x CML; C X MT e MT x MTML; (n = 6).

Pág. 44

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.a. Hipertensão Arterial Pulmonar

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é caracterizada pelo aumento da pressão na parede da artéria pulmonar, decorrente do aumento da resistência vascular pulmonar, que leva ao aumento da sobrecarga cardíaca no ventrículo direito. De acordo com McLaughlin *et al.* (2006) e Said *et al.* (2006), valores de pressão na artéria pulmonar em humanos acima de 25mmHg, caracterizam a doença que pode ser desenvolvida por pré-disposição genética, doenças coexistentes ou exposição a fatores ambientais.

A doença resulta em mudanças compensatórias no lado direito do coração, ou seja, um remodelamento cardiovascular para suportar o aumento da carga de trabalho imposta à musculatura cardíaca, progredindo para uma hipertrofia compensatória do ventrículo direito. Tal fato limita a capacidade física do indivíduo, diminuindo a sua qualidade de vida (Mereles *et al.* 2006; Coats *et al.* 1992).

Com relação à pressão arterial sistêmica, Werchan *et al.* (1989) não observaram alterações significativas em animais portadores dessa doença. Entretanto, Lamberts *et al.* (2007), demonstraram um aumento da pressão diastólica ventricular esquerda de ratos com HAP, como resultado do aumento do volume do ventrículo direito. Ishikawa *et al.* (1995), Seyfarth *et al.* (2000) e Chen *et al.* (2001) verificaram redução da pressão arterial média nesse modelo experimental.

No caso da HAP por pré-disposição genética, verifica-se mutação no gene BMPR2, o qual, em condições normais, estimula receptores TGF $\beta$  responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular, tanto no período embrionário quanto na maturação dos tecidos já formados. Dessa forma, a mutação deste gene favorece o efeito pró-apoptótico das células do endotélio pulmonar, aumentando o risco do desenvolvimento da HAP (Said *et al.* 2006 e Barreto *et al.* 2005).

Dessa forma geral, pacientes com HAP apresentam disfunção endotelial pulmonar, caracterizada pela diminuição da expressão da NO-sintase endotelial

(eNOS), enzima presente nas células endoteliais com conseqüente diminuição da síntese e liberação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio dos vasos pulmonares (Hongo *et al.* 2005, McLaughlin e McGoon, 2006). O NO, inicialmente descrito por Furchgott e Zawadski (1980) como fator de relaxamento derivado do endotélio, é a principal substância vasodilatadora endotelial.

Segundo Velez Roa *et al.* (2004), a HAP tem relação direta com o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático, sendo parcialmente mediada pelo reflexo quimiorreceptor devido à redução da concentração de oxigênio no sangue. Assim, além do remodelamento vascular e do aumento do trabalho da musculatura cardíaca, verifica-se, também, diminuição da saturação de oxigênio arterial e venoso conseqüente à disfunção pulmonar. Esse fato implica numa resposta fisiológica vasoconstritora para ajustar o fluxo sanguíneo pulmonar para as áreas de baixa ventilação devido à liberação de fatores constritores derivados do endotélio ao mesmo tempo em que os fatores relaxantes encontram-se reduzidos (Tagaya *et al.* 2001) sendo, também, uma das causas da HAP (Goret *et al.* 2005; e Favret *et al.* 2001).

Assim, verifica-se aumento da liberação endotelial de substâncias, tais como: a) endotelina 1, substância com ação mitogênica indutora de proliferação celular da musculatura lisa vascular (Goret *et al.* 2005 e McLaughlin e McGoon, 2006); b) tromboxano A<sub>2</sub> substância vasoconstritora que promove adesão plaquetária e trombos vasculares (Said *et al.* 2006; Barreto *et al.* 2005); c) fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que, em altas concentrações, causa lesões plexiformes pulmonares, ou seja, extravasamento de líquido celular e migração leucocitária, causando inflamação tecidual (Said *et al.* 2006); d) fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), responsável pela adesão plaquetária e mitogênese (Barreto *et al.* 2005 e Said *et al.* 2005).

Outras substâncias vasodilatadoras e anti-proliferativas produzidas pelo endotélio encontram-se reduzidas nesta doença, como as prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), por exemplo. Além disso, animais com HAP induzida por monocrotalina (MCT), apresentaram diminuição da produção do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), o que aumentou o estímulo para despolarização da célula

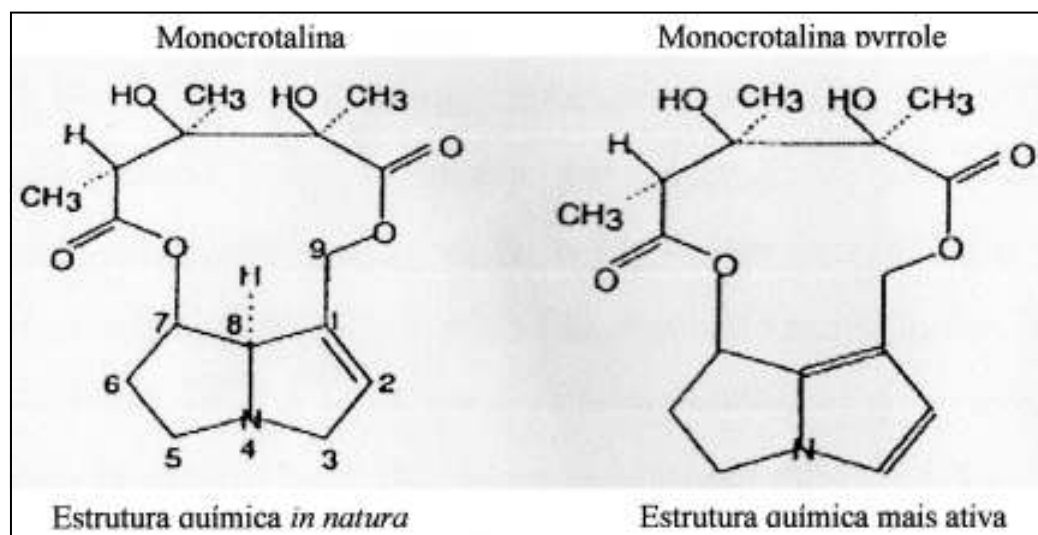
muscular lisa vascular e conseqüente vasoconstricção. Essa vasoconstricção pode tornar-se ainda mais significativa uma vez que também foi observada inibição de canais de  $K^+$  voltagem-dependentes (McLaughlin e McGoan, 2006) e diminuição na expressão de canais  $Na^+/K^+$  presentes na membrana da célula muscular lisa vascular, diminuindo a magnitude do relaxamento atribuído ao efluxo do  $K^+$  (Shubat *et al.* 1989), prejudicando, dessa forma, a modulação do tônus vasomotor pulmonar na HAP induzida por hipóxia (Post *et al.* 1992). Além disso, a diminuição das correntes de potássio pode estimular, por sua vez, a despolarização da musculatura lisa vascular acentuando o tônus vasoconstritor em animais portadores de HAP (Ito *et al.* 2000).

As mudanças funcionais induzidas pela HAP no sistema cardiopulmonar do rato ocorrem semelhantemente àquelas observadas em humanos (Pelá *et al.* 1990). Nesses animais, a HAP pode ser induzida a partir de injeção de monocrotalina (MCT), em dose única por via intraperitoneal. A MCT é uma substância alcalóide, presente em folhas e sementes da planta *Crotalaria Spectabilis*, (Bruner *et al.* 1983; Favret *et al.* 2001; Thomas *et al.* 1998; Santos *et al.* 2008).



*Crotalaria Spectabilis* (Fabaceae)

Segundo Bruner *et al.* (1983) e Taylor *et al.* (1997), após sua administração, a MCT é biotransformada pelo fígado em monocrotalina pyrrole (MCTP), sua forma ativa, exercendo sua toxicidade no sistema cardiopulmonar do rato. De acordo com Said *et al.* (2006), Barreto *et al.* (2005) e Kanno *et al.* (2001), um dos fatores relacionado à fisiopatologia da HAP induzida por MCT é a hipertrofia ventricular direita, seguido de remodelamento vascular cardíaco.



O efeito tóxico da MCT no rato é caracterizado por edema pulmonar, hidropericárdio e conseqüente fibrose, sendo que este modelo animal também apresenta aumento nos níveis de angiotensina 2, substância responsável pelo aumento do conteúdo de colágeno no tecido cardíaco (Lamberts *et al.* 2007; Brown *et al.* 1998; Lourenço *et al.* 2006) e aumento da resistência vascular periférica acarretando, conseqüentemente, em aumento da pressão arterial.

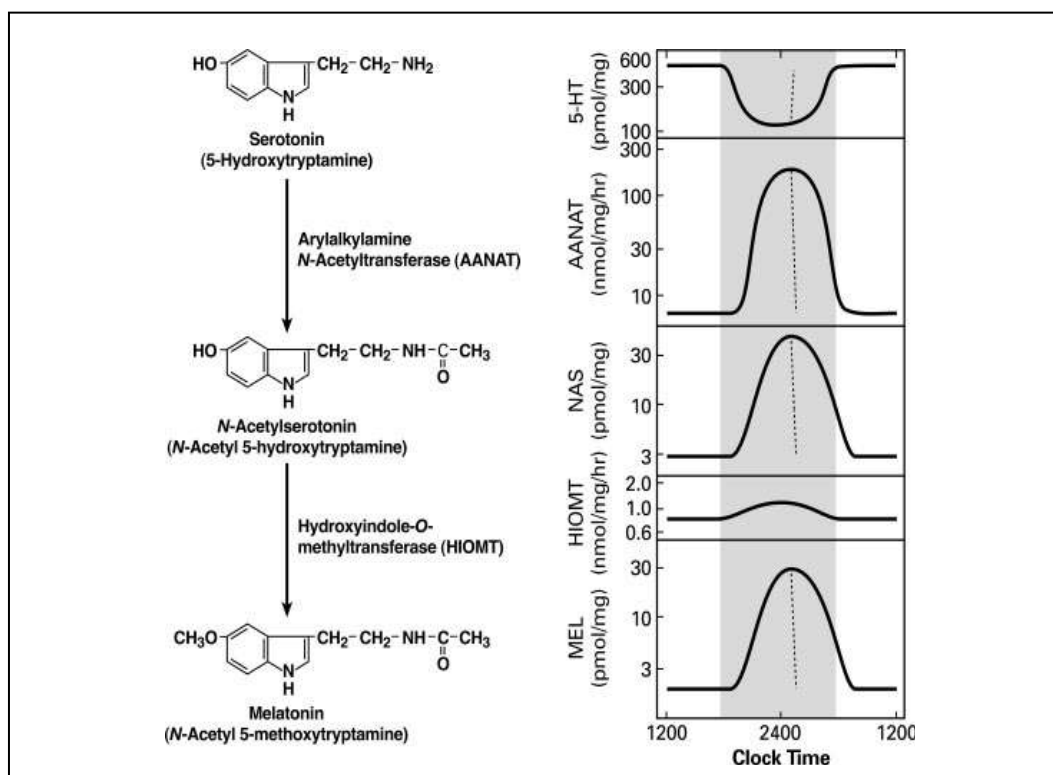
Além disso, esse modelo animal também apresenta inflamação pulmonar, diminuindo a capacidade deste órgão, juntamente com os rins, de eliminar a ET-1 em excesso no sangue e pulmões, aumentado ainda mais a concentração dessa substância altamente vasoconstritora (Miyauchi *et al.* 1993 e Barreto *et al.* 2005).

Como visto, o controle do tônus vascular é um importante fator na prevenção ou tratamento de doenças cardíacas, sendo que o endotélio participa de forma direta nessa regulação, exercendo funções autócrinas, parácrinas e endócrinas (Vogel, 1999). O conjunto de respostas vasodilatadoras e

vasoconstritoras endoteliais a estímulos físicos e farmacológicos denominam-se reatividade vascular (Luz *et al.* 2003).

### **1.b. Melatonina**

A melatonina, um hormônio produzido pela glândula pineal, é sintetizada predominantemente durante a noite, sendo que a luz tem efeito inibitório na sua secreção (Wurtman *et al.* 1964). A liberação de melatonina é sincronizada com o ciclo claro-escuro por um caminho multisináptico. A luz estimula a retina modulando a atividade do núcleo supraquiasmático (SCN) (Moore 1996), o qual funciona como um relógio biológico (Dubocovich *et al.* 1998). Neurônios GABA-érgicos são projetados a partir do SCN e do núcleo paraventricular (PVN) (Moore 1996) inibindo a saída constante de excitação para o núcleo intermediolateral simpático (Kalsbeek *et al.* 2000). A estimulação simpática do núcleo intermediolateral, após interpolação do gânglio superior cervical, é direcionada para a glândula pineal induzindo a síntese de melatonina (Moore 1996). A atividade da taxa limitante das enzimas na glândula pineal é regulada pela noradrenalina na ligação de receptores pineais  $\beta$ 1 e  $\alpha$ 1-adrenérgicos (Klein *et al.* 1983, Reiter 1991, Ribelayga *et al.* 1997). Sendo assim, outros sistemas neurohormonais, (sistema renina-angiotensina) também podem modificar a secreção de melatonina (Baltatu *et al.* 2002), exercendo papel importante na modulação das funções cardiovasculares pela melatonina. As concentrações de melatonina em indivíduos saudáveis são elevadas ( $10^{-10}$  a  $10^{-9}$  mol/l) durante a noite, enquanto, valores mais baixos são observados durante o dia (Kennaway e Voultzios 1998).



Síntese de melatonina nos pinealócitos adaptado do *Journal of Biological Chemistry*

A melatonina atua, principalmente, através de seus receptores de membrana (Costa *et al.* 1995). Contudo, a natureza lipossolúvel da melatonina permite que atue, também, intracelularmente através de seu receptor nuclear (Mor *et al.* 1999).

Desde a identificação dos sítios de ligação da melatonina (Vaneček *et al.* 1987), dois subtipos de receptores de membrana acoplados à proteína G foram identificados em mamíferos: MT<sub>1</sub> (anteriormente Mel1a ou mt<sub>1</sub>) e MT<sub>2</sub> (Mel1b) (Dubocovich *et al.* 1998). O receptor MT<sub>1</sub> está associado com vários segundos mensageiros; a) acoplado à proteína G<sub>i</sub> diminui os níveis de monofosfato de adenosina cíclico (Capsoni *et al.* 1994, Reppert *et al.* 1996, Witt-Enderby e Dubocovich 1996); b) acoplado à proteína G<sub>q</sub> ativa a fosfolipase-C resultando em aumento do cálcio citossólico (Brydon *et al.* 1999); c) acoplado à proteína G ativa canais de potássio (Nelson *et al.* 1996). Quanto aos receptores MT<sub>2</sub>, foi demonstrado que, acoplado à proteína G<sub>q</sub>, modula a hidrólise do 4-5-bifosfato de

fosfatidilinositol (Dubocovich 1995). O terceiro receptor tipo  $MT_3$ , o qual tem baixa afinidade, provavelmente, não está acoplado à proteína G (Mor *et al.* 1999).

Alta densidade de receptores de melatonina foi identificada no sistema nervoso central, particularmente na adenohipófise (Williams e Morgan 1988, Malpoux *et al.* 1995, 2001), núcleo supraquiasmático (Vaneček *et al.* 1987, Vaneček e Jansky 1989), núcleo paraventricular (Duncan *et al.* 1989) e área postrema (Williams *et al.* 1995). O receptor  $MT_1$  foi identificado no sistema cardiovascular em artéria caudal de ratos (Viswanathan *et al.* 1990), artérias coronárias humanas (Ekmekcioglu *et al.* 2001) e em coração de ratos (Abete *et al.* 1997), enquanto que o receptor  $MT_2$  foi encontrado em coração humano e artérias coronárias e aorta (Ekmekcioglu *et al.* 2003).

A localização precisa desses receptores não foi completamente esclarecida. Postula-se que, enquanto os receptores  $MT_1$  são localizados primariamente nas células do músculo liso vascular, os receptores  $MT_2$  são encontrados tanto em células endoteliais, quanto, em células do músculo liso vascular (Masana *et al.* 2002).

Quanto às propriedades antioxidantes da melatonina, verificou-se que elas são mais pronunciadas em doses farmacológicas (Ianas *et al.* 1991), sendo que a melatonina foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica mais eficientemente do que a vitamina C ou E (Gitto *et al.* 2001), em ratos. A potente capacidade antioxidante pode ser explicada pelo seu poder de seqüestrar radical hidroxila (Bromme *et al.* 2000), superóxido (Sewerynek *et al.* 1996), peroxila (Pieri *et al.* 1994) e também o radical livre óxido nítrico (Noda *et al.* 1999). A atividade antioxidante da melatonina é reforçada pela sua capacidade em aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, (Antolin *et al.* 1996, Barlow-Walden *et al.* 1995), da estabilidade da sua forma oxidada (Kojšová *et al.* 2006) e também da alta atividade seqüestradora de radicais livres de seus metabólitos (Tan *et al.* 2007). As propriedades antioxidantes da melatonina *in vivo* são demonstradas pela sua capacidade em reduzir a isquemia em coração (Tan *et al.* 1998), rins (Sahna *et al.* 2003), cérebro (Cho *et al.* 1997) e fígado (Sewerynek *et al.* 1996).



Melatonina, também, pode interagir diretamente com a calmodulina (Turjanski *et al.* 2004), inibindo os canais de cálcio (Satake *et al.* 1986, Shibata *et al.* 1989) ou estimulando a bomba de cálcio de cardiomiócitos (Chen *et al.* 1993). No sistema nervoso central, pelo fato da melatonina ativar receptores GABA-érgicos (Wang *et al.* 2003) juntamente com sua capacidade de reduzir a carga oxidativa, esse hormônio pode participar da regulação do tônus simpático.

Assim, o sistema cardiovascular sofre influência desse neurohormônio secretado pela glândula pineal. Segundo MACCHI e BRUCE (2004), existe maior risco de derrame e infarto do miocárdio no período da manhã coincidindo com a queda dos níveis de melatonina e, ainda, paciente com doença coronariana, quando comparados a indivíduos normais, apresentam níveis diminuídos de melatonina noturna acompanhada por aumento de noradrenalina. GUVEN e colaboradores (2007), também verificaram que a melatonina produziu efeito cardioprotetor frente à cardiotoxicidade induzida por epirrubicina, um agente quimioterápico de amplo espectro do grupo dos antraciclina, em ratos.

Diferentemente da vitamina C, melatonina por apresentar característica lipossolúvel atravessa as barreiras biológicas facilmente (Kokkola T, 2007), diminuindo as arritmias cardíacas e reduzindo a oxidação lipídica conseqüente de processos isquêmicos cardíacos (Reiter RJ, 2007).

Frente ao exposto, o uso terapêutico da melatonina pode ser uma estratégia para a prevenção dos efeitos deletérios da HAP sobre o parênquima pulmonar e o sistema cardiovascular.

## **2. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da melatonina sobre a resposta contrátil da artéria pulmonar, a condução elétrica cardíaca, a pressão arterial e a histologia do coração e dos pulmões de ratos Wistar portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Animais.**

O protocolo experimental para este estudo foi aprovado pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, protocolo N°. 1647-1. Ratos Wistar adultos pesando, aproximadamente 250 g., colocados em gaiolas coletivas, cinco animais em cada, foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum* mantida em Biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia, em ambiente com temperatura de 20 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12h00min.

#### **3.2. Grupos experimentais.**

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=5): CO (controle); CML (controle melatonina); MT (monocrotalina); MTML (monocrotalina+melatonina). A HAP foi induzida por dose única de monocrotalina (Crotaline) SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO. USA, foi administrada intraperitonealmente (60 mg/Kg (i.p.) dissolvida em solução salina (NaCl) 0,9 %, pH 7.4, (*Am. J Physiol Heart Circ Physiol May 25, 2007*). Melatonina - SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO. USA) administrada intraperitonealmente (15 mg/Kg i.p.) dissolvida em solução salina (NaCl) 0,9% e etanol (*J. Pineal Res. 2003; 35:75-79*) e administrada diariamente, no horário entre 10:00h e 12:00h, durante os 28 dias do período experimental. Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico (ketamina 100 mg/kg + xilazina 7 mg/kg de peso corpóreo i.m.) para a realização dos procedimentos experimentais.

### 3.3 Reatividade Vascular

#### 3.3.1. Obtenção de anéis vasculares

Ao final do período experimental, os ratos foram eutanizados sendo retirada a artéria pulmonar e colocada em placa de Petri contendo tampão de Krebs. A artéria foi limpa de toda gordura, tecidos aderentes e cortada em anéis de 3 mm, o endotélio foi mantido intacto. Cada artéria pulmonar foi dividida em dois anéis: em cada experimento, três ratos forneceram seis anéis. Cada anel foi montado em dois ganchos com formato de L colocados em banho de órgãos com 20 ml de solução de Krebs, o qual foi mantido à temperatura de 37 °C, pH 7,4 e constantemente borbulhado com mistura de 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. A composição da solução tampão de Krebs (pH 7,4) foi a seguinte (mM): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, Glicose 11.1. melatonina, foi inicialmente dissolvida em etanol (30%) e diluída imediatamente no tampão de Krebs antes do uso. Arterenol (bitartarato de noradrenalina) foi preparada em solução de ácido ascórbico 2% e armazenada a -20°C, por no máximo sete dias. (Anwar *et al.* 2001 e Lewis *et al.* 1999).

#### 3.3.2. Preparação dos anéis da artéria pulmonar

Os anéis vasculares foram testados para resposta a diferentes concentrações de noradrenalina (NA) com ou sem pré-tratamento com melatonina. Melatonina (10<sup>-4</sup> M) foi adicionada ao banho de órgãos por 20 min, antes de outros agentes vasoativos (Anwar *et al.* 2001, e Lewis *et al.* 1999). Os anéis foram gradualmente estirados para atingir a tensão de um grama (0,5 g) (o qual representa a tensão de repouso para a obtenção de resposta ótima de atividade), por um período de quarenta minutos. Durante o período de 30 minutos de estabilização, houve troca de solução tampão a cada 15 min. Após a lavagem, os anéis foram estimulados por intervalos de 10 minutos, com 100µl 10<sup>-6</sup>M de NA até a reprodução da contração ser concluída. O procedimento completo da estabilização e realização da contração promovida pela NA (10<sup>-6</sup>M) foi realizado para cada anel antes de iniciar o experimento. Antes do experimento, foi realizada

uma avaliação de todos os procedimentos a serem usados. Para cada série de experimentos, foi usado um anel de artéria pulmonar de animais dos grupos: CO, CML, MT e MTML.

### **3.3.3. Procedimento experimental**

Foi determinado o efeito do pré-tratamento com melatonina sobre a resposta contrátil de anéis isolados de artéria pulmonar para noradrenalina. Foram feitas curvas cumulativas para resposta-contrátil para NA (Lewis et al 1999 e Geary et al. 1998). A pré-contração de cada anel com NA (1 $\mu$ M) no procedimento de estabilização, atua como controle para o cálculo da contração dos anéis em resposta a NA. Para o registro das tensões desenvolvidas, foi utilizado um transdutor isométrico de tensão Narco Bio-System (modelo F-60), conectado a um polígrafo de 4 canais Narco Bio-System (modelo DMP-4, Houston, TX, EUA).

### **3.3.4. Obtenção da curva concentração-efeito**

A curva concentração-efeito (CCE) para cada agonista foi obtida pelo método cumulativo, com incrementos sucessivos de 0,5 unidades logarítmicas na concentração molar de agonista. A resposta máxima foi determinada a partir de três concentrações sucessivas crescentes do agonista não promovessem respostas maiores que a obtida com a concentração imediatamente anterior. A sensibilidade dos anéis das artérias aorta e pulmonar foi avaliada pela determinação do valor pD<sub>2</sub> de cada agonista. Este corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina uma resposta igual a 50% da resposta máxima (EC<sub>50</sub>) em cada experimento. Em cada anel foi obtida uma CCE para a noradrenalina (10<sup>-10</sup> - 10<sup>-4</sup>M). (Ting N *et al.* 2000, Das R. *et al.* 2008 e Cabrini F.P. H., 2009)

### **3.4. Parâmetros eletrocardiográficos.**

O eletrocardiograma (ECG) foi realizado em eletrocardiógrafo computadorizado, modelo Heart Ware, com os animais sob anestesia. Os eletrodos, em forma de agulha, foram fixados subcutaneamente nas quatro

posições convencionais, nos membros estendidos com os animais na posição supina. Os registros foram realizados nas derivações bipolares (DI, DII e DIII) e amplificadas (aVR, aVL e aVF), com velocidade 50mm/segundo e sensibilidade 2N. Foram determinadas a frequência cardíaca, a amplitude e duração das ondas e duração dos intervalos e segmentos eletrocardiográficos. (Costa *et al.* 2008; Henkens *et al.* 2007; Henkens *et al.* 2008-B).

### **3.5. Pressão Arterial – método direto.**

Os animais foram anestesiados como descrito anteriormente. A seguir, uma cânula (PE 10) acoplada a outra cânula (PE 50) foi introduzida na artéria carótida direita e conectada a um transdutor de pressão arterial para obter registro da pressão arterial sistólica através do equipamento BP-1-Analog single-channel transducer signal conditioner (World Precision Instruments). (Briaud *et al.* 2004)

### **3.6. Parâmetros morfológicos**

Os corações e os pulmões dos animais foram isolados após serem submetidos à eutanásia e, logo em seguida, foram pesados e colocados em solução de Bouin por 72 horas. Em seguida cada órgão foi lavado sucessivamente em solução contendo tampão fosfato e salina e desidratados com álcool 70% durante 16 horas. Após esta passagem, seguiu-se desidratação com álcool 80% (1 hora), álcool 95% (1 hora), quatro passagens por álcool 100% (30 minutos cada passagem) e álcool 100%+xilol (1:1) por 30 minutos em estufa. Após, os tecidos foram transferidos para forma contendo parafina, permanecendo em estufa por 3 horas. Após resfriamento, cada bloco foi retirado das formas e o excesso de parafina removido. Os cortes histológicos foram realizados com micrótomo e fixados em lâminas com albumina. Após a fixação em lâminas, os cortes foram corados pelos métodos de hematoxilina eosina (HE) e pelo Ácido de Schiff. Foram obtidas imagens das lâminas no microscópio Leica (40X e 100x) sendo realizada a análise histológica utilizando-se o *software* Image Pro Plus.

### **3.7. Análise estatística**

Foi utilizado o software Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA), para os cálculos estatísticos. A comparação entre os valores dos parâmetros analisados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação entre três ou mais grupos. O teste t de student foi utilizado para comparar dois grupos distintos. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

Para a reatividade vascular, os dados das CCE, valores  $pD_2$  e  $R_{máx}$  foram apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise de regressão linear foi usada para determinar valores de  $pD_2$  do agonista. As curvas concentração–efeito foram realizadas através de software Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA), com valores para resposta na ausência de agonista iguais a zero. A comparação entre os valores dos parâmetros analisados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, para comparação entre os grupos. O teste t de student foi utilizado para comparação dentro de um mesmo grupo ou comparar dois grupos distintos. Em todos os casos, valores de  $p < 0,05$  foram aceitos como indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1 Reatividade Vascular**

Os resultados da reatividade vascular da artéria pulmonar mostraram que os animais tratados com monocrotalina (MT) apresentaram redução significativa da resposta contrátil à noradrenalina devido, provavelmente, à lesões endoteliais induzidas por esse fármaco, em relação ao grupo CO, caracterizando a ação deletéria da monocrotalina no endotélio vascular. Por outro lado, os animais do grupo controle previamente tratados com melatonina (CML) apresentaram redução da resposta contrátil em relação ao grupo CO, fato este também verificado no grupo MTML em relação ao MT (figura 1; tabela 1).

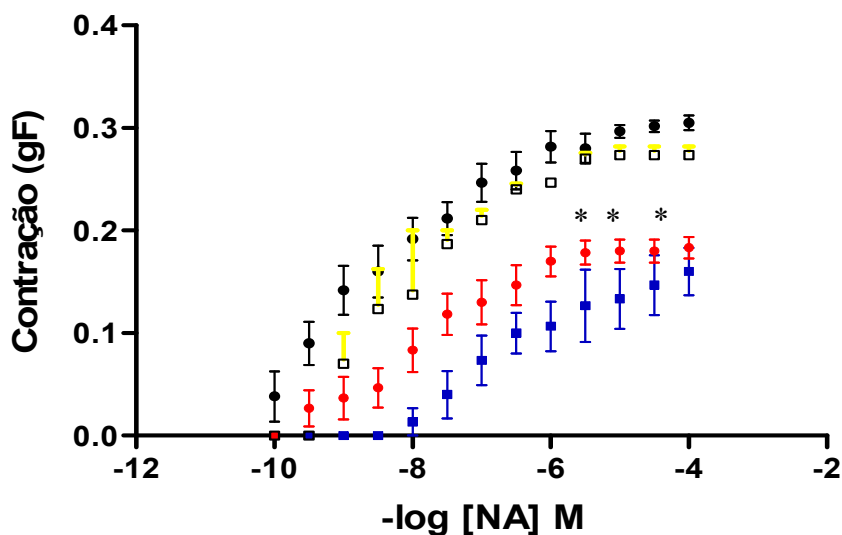


Figura 1

Tabela 1 Grupos	Noradrenalina	
	pD <sub>2</sub>	Rmáx (%)
CO	6,886 ± 0,147	0,305 ± 0,007
CML	7,142 ± 0,011	0,1865 ± 0,016
MT	7,741 ± 0,156	0,183 ± 0,010
MTML	6,865 ± 0,2922	0,160 ± 0,023

**Figura 1 e Tabela 1.** Valores pD<sub>2</sub> e Rmáx (%) das CCE, apresentados como média ± EPM referentes ao tratamento com melatonina (MEL) em anéis de artéria pulmonar com endotélio dos grupos controle+noradrenalina (CO NA) (○), monocrotalina+noradrenalina (MT NA) (●), controle melatonina+noradrenalina (CML NA) (□) e (monocrotalina-melatonina + noradrenalina (MTML NA) (■). Análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey (p < 0,05) para: (a) CO NA (0,305 ± 0,007) vs MT NA (0,183 ± 0,010) (\*), (b) CO NA (0,305 ± 0,007) vs MTML NA (0,160 ± 0,023) (\*), (c) MT NA (0,183 ± 0,010) vs MTML NA (0,160 ± 0,023) (ns); n = 3 (\*) significativo (p < 0,05) e (ns) não significativo.

Com relação aos animais controle, a melatonina exerceu efeito relaxante devido, provavelmente, à elevação dos níveis de óxido nítrico endotelial, bem como pela prevenção da oxidação por “seqüestro” de oxigênio livre (Reiter R J



1997). Entretanto, pelo fato da monocrotalina provocar, também, lesões no endotélio vascular, acreditamos que a melatonina possa ter atuado de forma independente do endotélio, como verificado no grupo MTML, diretamente sobre o músculo liso vascular reduzindo a concentração intracelular de cálcio tanto pela redução da formação de Inositol Trifosfato (IP3), quanto pelo bloqueio do influxo de cálcio por canais voltagem dependentes. A redução da concentração de cálcio disponível no citoplasma pode diminuir a interação entre as proteínas contráteis do músculo liso, reduzindo, assim, a resposta contrátil à noradrenalina nos grupos tratados previamente com melatonina (CML e MTML).

Nossos resultados estão de acordo com Ting N *et al.* 2000, Das R. *et al.* 2008 e Cabrini F.P.H., 2009, obtidos em artéria pulmonar de ratos com hipertensão arterial pulmonar.

#### **4.2. Parâmetros eletrocardiográficos (ECG)**

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2005), tem se valorizado técnicas não invasivas para o diagnóstico de determinadas doenças sem a necessidade de exames invasivos. No que diz respeito à hipertensão pulmonar, é importante enfatizar que a avaliação do paciente com o uso de metodologia não invasiva satisfaz alguns aspectos, porém não todos. Neste sentido, existe consenso na literatura sobre o fato de que, tanto a definição do estado hipertensivo como os critérios da resposta da circulação pulmonar a estímulos vasodilatadores, são baseados estritamente em medidas hemodinâmicas invasivas.

Dessa forma, o eletrocardiograma, por exemplo, pode ser um método auxiliar extremamente útil no prognóstico do tratamento de indivíduos portadores de hipertensão arterial pulmonar.

Recentes estudos em ratos e humanos têm demonstrado que doenças que levam ao aumento da pressão ventricular direita causam significativas alterações nas propriedades elétricas do miocárdio, as quais são detectadas pelo eletrocardiograma convencional de 12-derivações (Costa *et al.* 2008; Henkens *et al.* 2007; Henkens *et al.* 2008-B).

Os registros eletrocardiográficos realizados em ratos variam de acordo com

o tipo de técnica de gravação utilizada, presença ou ausência de anestesia, tipo de agente anestésico, posição do animal durante o registro, características do amplificador e velocidade e amplitude do registro. A idade, o peso, o sexo e a forma de contenção do animal são fatores que também precisam ser considerados para o registro e análise do eletrocardiograma de rato.

O rato apresenta eletrocardiograma de difícil interpretação patológica em face de sua peculiar morfologia e alta frequência cardíaca, quando analisado isoladamente, de forma não seriada, ao longo de qualquer processo patológico que pode acometer o coração. A orientação anatômica do coração do rato é semelhante à do homem, ou seja, os ventrículos direito e esquerdo encontram-se na posição anterior e posterior do coração. Conseqüentemente, as forças iniciais de ativação (despolarizantes) do músculo cardíaco deslocam-se da esquerda para a direita do coração; entretanto, são de baixa amplitude e, dependendo da posição do coração, são responsáveis pela forma aguda da onda Q.

Por outro lado, o vetor de ativação do ápice ventricular apresenta sentido da direita para a esquerda e de cima para baixo, evidenciado pela maior amplitude da onda R em todas as derivações, apresentando-se negativa em aVR. A última região do coração do rato a ser ativada é a base do ventrículo esquerdo representada pela presença invariável de uma onda S, de baixa amplitude, em todas as derivações. A onda Q pode apresentar-se de forma rudimentar ou ausente. Ocasionalmente, uma discreta onda Q é observada em aVL. A onda S, por outro lado, é registrada em quase todas as derivações. A onda R é sempre registrada invertida na derivação aVR. .

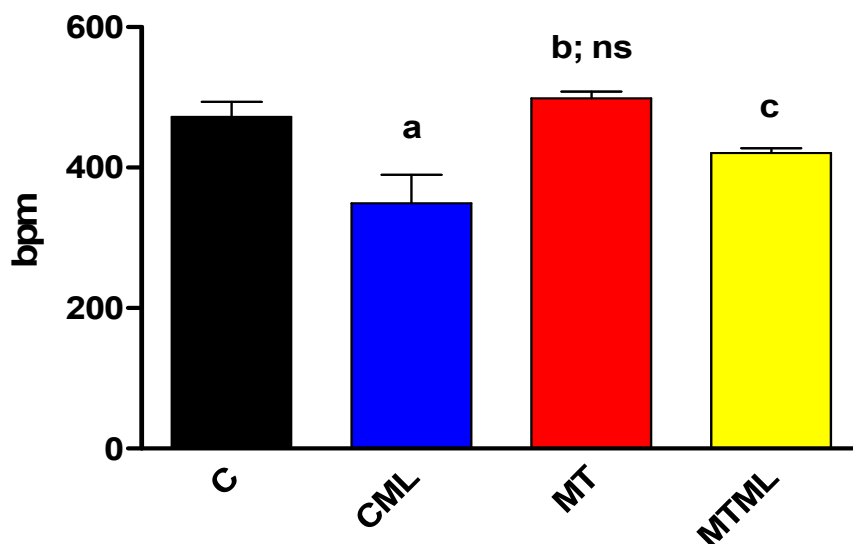
O eixo elétrico ventricular mostra-se na posição vertical, indicando que o ápice do coração está próximo da linha média do esterno (entre  $+60^\circ$  e  $+90^\circ$ ). Os valores do eixo podem ser calculados tendo-se como referências o complexo QRS e onda T, segundo orientação espacial do sistema hexaxial. Assim, tem-se observado, em ratos normais, valores de  $+49.60^\circ \pm 22.6^\circ$  para a orientação espacial do vetor correspondente ao complexo QRS no plano frontal.

Em contraste com o modelo de repolarização do ventrículo humano, o processo de repolarização dos ventrículos do rato apresenta um componente

muito rápido, sendo que o pico da onda T ocorre imediatamente após a onda R, proporcionando falsa elevação do segmento S-T. Deve-se destacar que a o segmento S-T curto ou mesmo ausente, se deve à repolarização ventricular no coração do rato começar antes mesmo que a despolarização ventricular tenha terminado.

Quanto maiores os níveis pressóricos na circulação arterial pulmonar, maior a sensibilidade do eletrocardiograma na detecção destes parâmetros (Henkens *et al.* 2008-B). Pelo fato da existência de alterações nas dimensões das câmaras cardíacas produzidas pela HAP, decidimos determinar, também, os intervalos QT e QTc para avaliação do risco de morte súbita em função de prováveis alterações na condução elétrica em ventrículos hipertróficos.

Com relação à frequência cardíaca, os grupos CO e MT apresentaram ritmo sinusal não diferindo entre si nos períodos estudados, apesar da tendência de aumento no grupo MT (**figura 2**). Segundo Usui *et al* (2006), animais portadores de HAP apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de substâncias excitatórias da função cardíaca, como noradrenalina e angiotensina II, o que poderia ter provocado efeito cronotrópico positivo nos animais do grupo MT, o que não ocorreu neste experimento. Acreditamos que tal fato possa ser conseqüente, provavelmente, à alteração do número ou a sensibilidade de receptores adrenérgicos promovida pela HAP, o que justificaria os resultados observados nos nossos animais tratados com monocrotalina (Velez-roa *et al.* 2004).



**Figura 2.** Freqüência Cardíaca dos ratos dos grupos controle (C), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (C) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) pelo período de 28 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) C X CML, (b) C X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; (n = 5).

De fato, ratos portadores de HAP induzida por monocrotalina podem apresentar diminuição do número de receptores alfa e beta adrenérgicos, principalmente no ventrículo direito, reduzindo a resposta dos tecidos cardiovasculares a substâncias agonistas simpáticas (Leineweber *et al.* 2003; Seyfarth *et al.* 2000).

Como vimos anteriormente, a redução da reatividade vascular à noradrenalina dos ratos do grupo MT suporta nossa hipótese, estando em acordo com os autores que verificaram que a exposição prolongada dos receptores cardiovasculares  $\alpha$  a altas concentrações deste neurotransmissor ocasionou *down regulation* desses receptores, neste mesmo modelo experimental (Oriowo *et al.* 2003; Dhein *et al.* 2002; Shubat *et al.* 1989). Pretendemos testar essa hipótese em estudos subseqüentes.

No sistema nervoso central, a melatonina pode ligar-se e ativar receptores GABA-érgicos (Wang *et al.* 2003) juntamente com sua capacidade de reduzir a carga oxidativa, atuando na sinalização do NO, participando na regulação do

tônus simpático.

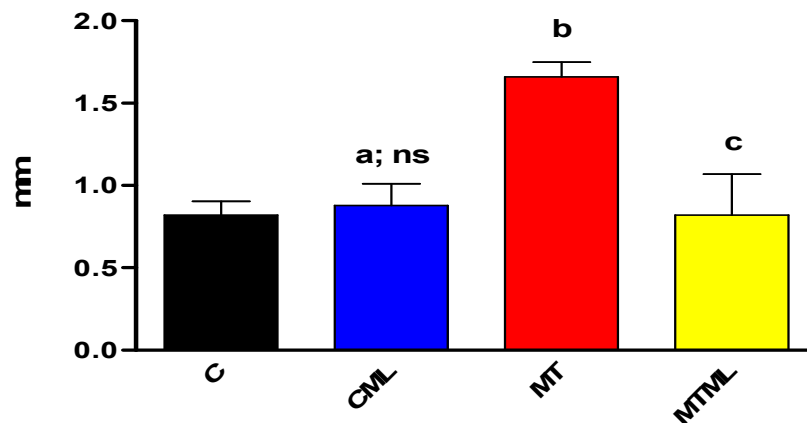
Quanto aos animais dos grupos tratados com melatonina (CML e MTML), seu efeito reduziu significativamente a frequência cardíaca devido, provavelmente, à redução da atividade simpática promovida por essa indolamina.

Nossos resultados estão de acordo com Nishiyama *et al.* 2001 e Ray C.A. (2003).

Dentre os parâmetros eletrocardiográficos registrados pelo ECG, aqueles que se mostram mais sensíveis às variações cardiovasculares induzidas pela HAP são: onda P *pulmonale* (apiculada maior amplitude em DII), duração do complexo QRS, eixo elétrico ventricular.

Os resultados da amplitude da onda P do ECG encontram-se na **figura 3**. Observou-se aumento significativo da onda P no grupo MT em relação ao controle. De fato, um dos sinais clínicos para diagnóstico da HAP é a presença da onda P apiculada em consequência da sobrecarga do lado direito do coração e, dessa forma, do átrio direito.

Assim, nossos resultados corroboram com dados da literatura onde foram observados aumento da amplitude da onda P em DII em indivíduos portadores de HAP. Henkens *et al* (2008-A; 2008-B) e Ivo *et al* (2008) destacam ainda, a importância da análise eletrocardiográfica da onda P para o prognóstico do tratamento de pacientes portadores de hipertensão arterial pulmonar (Karlner *et al* 1985), como parâmetro para análise da eficácia terapêutica.



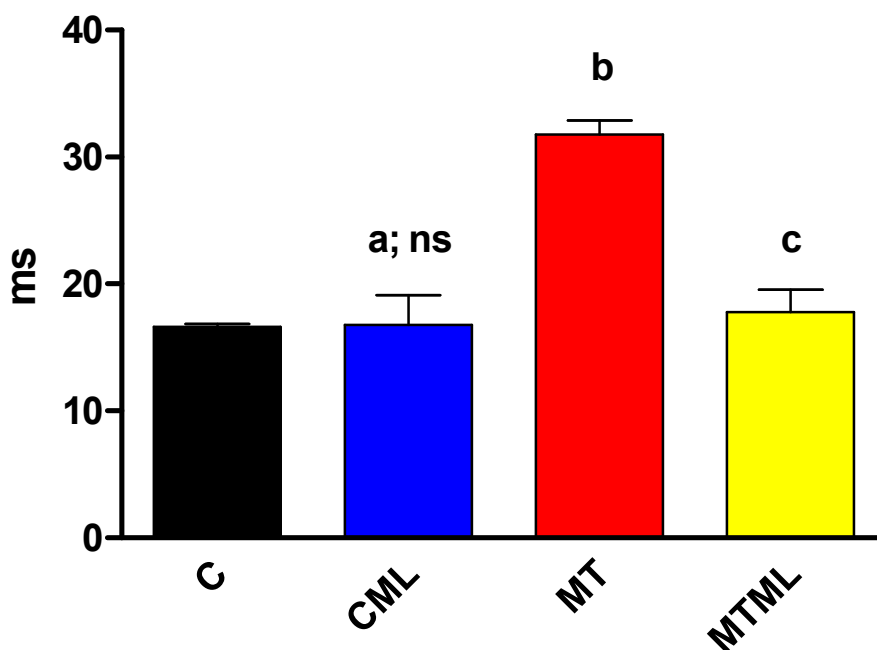
**Figura 3.** Amplitude da onda P dos ratos dos grupos controle (C), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (C) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) durante 28 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) C X CML, (b) C X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; (n = 5).

provavelmente, à redução da hipertrofia ventricular direita e, conseqüentemente, da sobrecarga imposta por essa doença ao átrio e ventrículo direito.

De fato, os dados referentes, à duração do complexo QRS (**Figura 4.**) e do eixo elétrico ventricular (**Figura 5.**) confirmaram nossa proposição em relação à amplitude da onda P, como veremos a seguir.

Com relação à ativação elétrica ventricular, os resultados mostraram um aumento da duração do complexo QRS nos ratos com HAP, ao final do período experimental (**Figura 4**) devido, provavelmente, ao aumento da espessura do ventrículo direito dos animais portadores de HAP. Nossos resultados são corroborados por Henkens *et al.* (2007), os quais ponderaram que alterações na magnitude do QRS podem ser explicadas pelo aumento da contribuição do ventrículo direito para a atividade despolarizante ventricular.

Por outro lado, a melatonina preveniu o aumento da duração do complexo QRS, atenuando as alterações no miocárdio induzidas pela hipertensão arterial pulmonar (**Figura 4**).

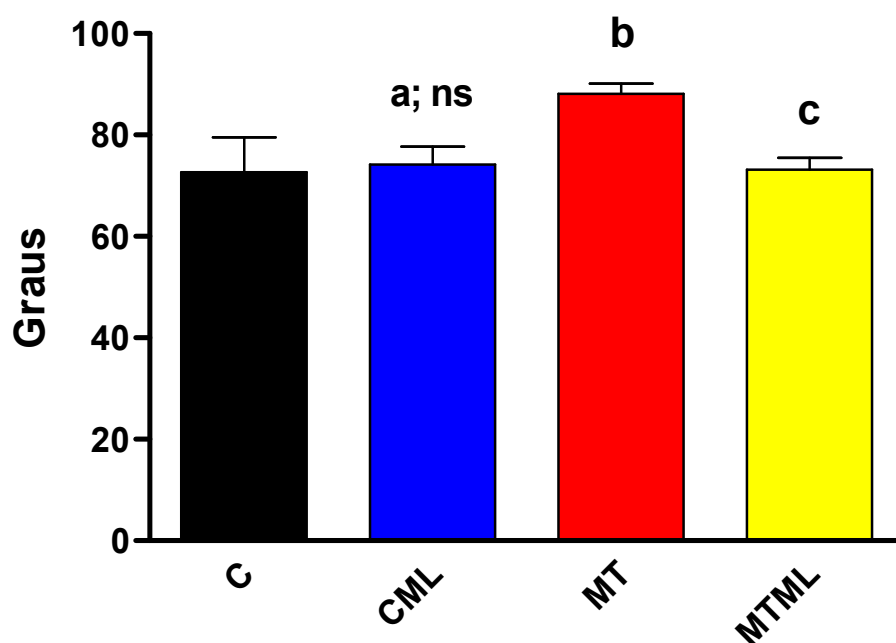


**Figura 4.** Intervalo QRS dos ratos dos grupos controle (C), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (C) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) durante o período de 30 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) C X CML, (b) C X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; (n = 5).

A determinação do eixo elétrico médio ventricular (SÂQRS) nos permitiu verificar o grau da provável hipertrofia ventricular nos grupos experimentais (**Figura 5**). Assim, observamos desvio do eixo para a direita nos animais portadores de HAP resultante do provável aumento da massa ventricular direita.

Nossos resultados estão de acordo com autores que também verificaram desvio do eixo elétrico ventricular para a direita em pacientes (Bossone *et al.* 2003; Folino *et al.* 2003) e em ratos (Henkens *et al.* 2007; 2008-A; 2008-B) portadores de hipertensão arterial pulmonar.

Por outro lado, o tratamento com melatonina reduziu o desvio do eixo elétrico para a direita, mantendo-o próximo dos valores encontrados para o grupo controle, sugerindo preservação das dimensões do ventrículo direito no grupo MTML.



**Figura 5.** Eixo Elétrico Ventricular (SÂQRS) no plano frontal dos ratos dos grupos controle (CO); controle melatonina (CML); portadores de HAP após a administração de monocrotalina (MT) e portadores de HAP após a administração de monocrotalina tratados com melatonina (MTML). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) C X CML, (b) C X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; ( $n = 5$ ).

O atraso na condução intraventricular verificada pelo aumento da duração do complexo QRS, em consequência da provável hipertrofia do ventrículo direito, nos animais com HAP pode acarretar arritmias ventriculares importantes. Com

esse propósito, avaliamos o intervalo QT do eletrocardiograma, bem como o ajuste desse intervalo em função da frequência cardíaca (QTc).

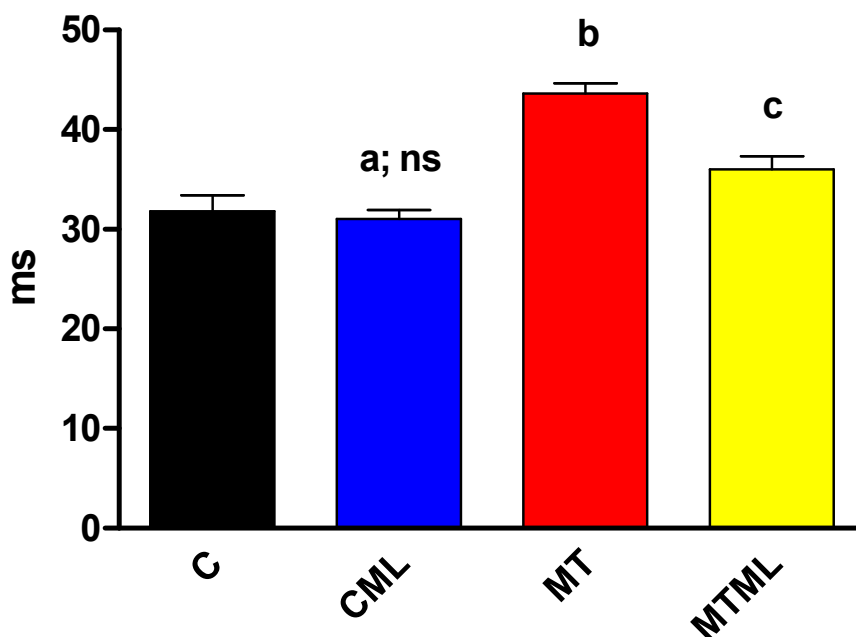
Os resultados do intervalo QT encontram-se na **Figura 6**. Observamos significativo aumento do intervalo QT nos animais do grupo MT, em relação ao grupo CO, predispondo esses animais à morte súbita decorrente de arritmia ventricular. De fato, Satoh *et al.* (2004), atribuíram à hipertensão pulmonar as alterações cardíacas responsáveis pelo óbito de uma paciente.

Embora não tenha sido possível explicar neste estudo o mecanismo pelo qual a hipertensão arterial pulmonar promoveu prolongamento do intervalo QT, acreditamos que o aumento tenha sido causado por prejuízo na repolarização do potencial de ação ventricular. Nossos resultados e proposição são corroborados por Uchino *et al.* (2008), os quais também encontraram prolongamento do intervalo QT em ratos tratados com monocrotalina e sugeriram a hipótese de alterações no funcionamento de canais voltagem-dependentes responsáveis pelo influxo de sódio e de canais transitórios de potássio pelos quais ocorre o efluxo desse íon.

Por outro lado, a melatonina reduziu significativamente o aumento do intervalo QT dos animais tratados com monocrotalina, em concordância com os demais parâmetros eletrocardiográficos observados neste experimento.

Assim, a melatonina proporcionou nos animais tratados com monocrotalina menor desvio do eixo para a direita em consequência, provavelmente, do menor grau de hipertrofia ventricular direita o que acarretou em redução do intervalo QT e, conseqüentemente, na prevenção do risco de morte súbita decorrente das alterações cardíacas desencadeadas pela hipertensão arterial pulmonar.





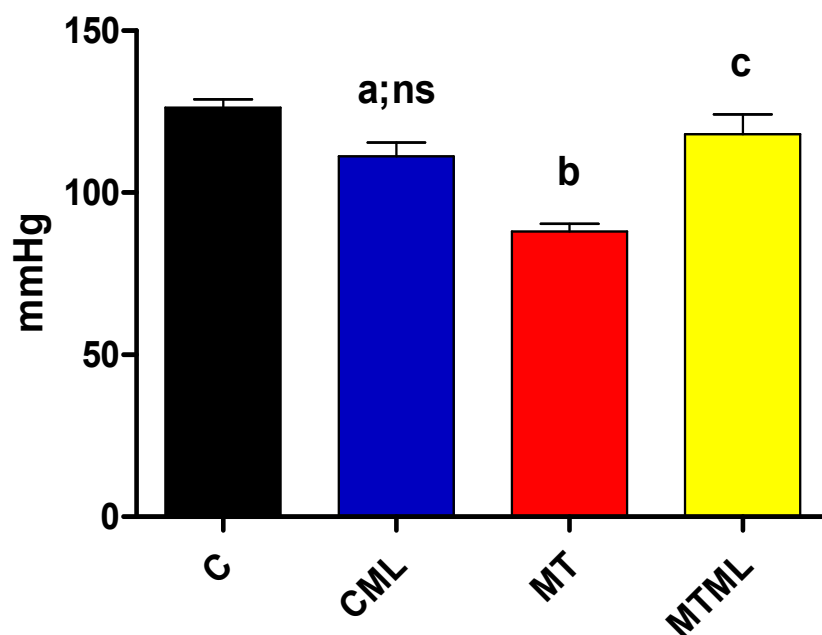
**Figura 6.** Intervalo QT dos ratos dos grupos controle (C), controle melatonina (CML), monocrotalina (MT) e monocrotalina + melatonina (MTML). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única intraperitoneal (60mg/kg de peso corpóreo) nos grupos (C) e (MTML), sendo que os grupos (CML) e (MTML) receberam doses diárias de melatonina (15 mg/kg de peso corpóreo) pelo período de 28 dias. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; ( $p < 0,05$ ): (a) C X CML, (b) C X MT, (c) MTML X MT, (ns) não significativo; ( $n = 5$ ).

#### 4.3. Pressão arterial média.

O termo pressão arterial média refere-se à pressão média entre as pressões sistólica e diastólica, em relação ao tempo do ciclo cardíaco. Dessa forma, a pressão diastólica exerce papel preponderante na determinação da pressão arterial média, em relação à pressão sistólica, pelo fato coração permanecer em diástole durante maior parte do ciclo.

Como pode ser visto na **figura 7**, a monocrotalina reduziu significativamente a pressão arterial média no grupo MT, em relação ao grupo CO, enquanto que a melatonina reduziu a pressão arterial média no grupo controle (CML) e restabeleceu níveis pressóricos normais nos animais tratados com monocrotalina (MTML). Nossos resultados estão de acordo com Hayashi *et al* (1988) e Chen *et al* (2001), os quais também verificaram redução da pressão

arterial média sem alterações significativas nas pressões sistólica e diastólica em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. Segundo esses autores, dos diversos mecanismos propostos para se explicar a redução da pressão arterial média em animais portadores de hipertensão arterial pulmonar, parte dessa resposta pode ser atribuída à diminuição da degradação da prostaglandina PGE<sub>2</sub> nos pulmões lesados pela monocrotalina, o que provocaria uma resposta vasodilatadora periférica. Ainda, postula-se a possibilidade de ocorrer, nesse modelo experimental, alterações na atividade pulmonar da Enzima Conversora de Angiotensina reduzindo, dessa forma, a produção de Angiotensina II, substância de grande atividade vasoconstritora.



**Figura 7.** Pressão arterial Média dos animais dos grupos controle (CO); grupo controle tratado com melatonina (CML); grupo tratado com monocrotalina (MT); grupo tratado com monocrotalina + melatonina (MTML), ao final do período experimental. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão;  $p < 0,05$  para: (a) CO X CML; (b) CO X MT; (c) MT X MTML; (ns) não significativo;  $n = 4$ .

Por outro lado, em outro experimento com ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com melatonina, a redução da pressão sanguínea e a frequência cardíaca estavam associadas à vasodilatação dependente de endotélio e aumento da sensibilidade para o inibidor da enzima óxido nítrico sintase (Girouard *et al.* 2001) sugerindo melhora na sinalização do óxido nítrico. Esta hipótese foi apoiada pela observação do aumento dos níveis de cálcio citossólico em células endoteliais (Pogan *et al.* 2002), os quais podem resultar num aumento na produção de óxido nítrico via aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase, aumentando níveis de GMP cíclico e diminuição do cálcio intracelular nas células do músculo liso com subsequente vasodilatação (Anwar *et al.* 2001). Interessantemente, o antioxidante N-acetilcisteína reduziu a pressão sanguínea, frequência cardíaca, concentração de catecolaminas e a expressão de  $\beta$ -adrenoceptores (ambos enfraquecidos em SHR) em níveis similares à da melatonina (Girouard *et al.* 2003). Além disso, a diminuição da pressão sanguínea e aumento do barorreflexo em SHR estão correlacionados com a melhora da capacidade antioxidante após a administração de melatonina em longo prazo (Girouard *et al.* 2004) sugerindo uma associação das propriedades antioxidantes da melatonina com sua capacidade de diminuir o tônus simpático.

Tendo em vista os resultados obtidos neste experimento, acreditamos que a melatonina possa ter atenuado as alterações cardiovasculares e pulmonares induzidas pela monocrotalina devido, provavelmente, a sua ação antioxidante. Tal fato pode ter proporcionado recuperação da função pulmonar na síntese e degradação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras essenciais para a manutenção do tônus vascular e, assim, restabelecer valor da pressão arterial média semelhante aquele verificado nos animais controle, preservando, assim, a perfusão tecidual.

#### 4.4 Histologia Cardíaca

A **Figura 8** apresenta fotomicrografia de corte transversal de artéria cardíaca de ratos dos grupos controle e do grupo controle melatonina. Observam-se túnica média, camada adventícia e lúmen vascular, com dimensões semelhantes entre os grupos.

Por outro lado, na **Figura 9**, a fotomicrografia de corte transversal da artéria cardíaca de ratos do grupo portadores de HAP (MT) apresentam aumento da espessura da túnica média e diminuição do lúmen vascular, indicando processo hipertrófico. Já o grupo de animais portadores de HAP tratado com melatonina (MTML), apresentou redução no espessamento da túnica média, assim como aumento do lúmen vascular em relação ao grupo de animais portadores de HAP.

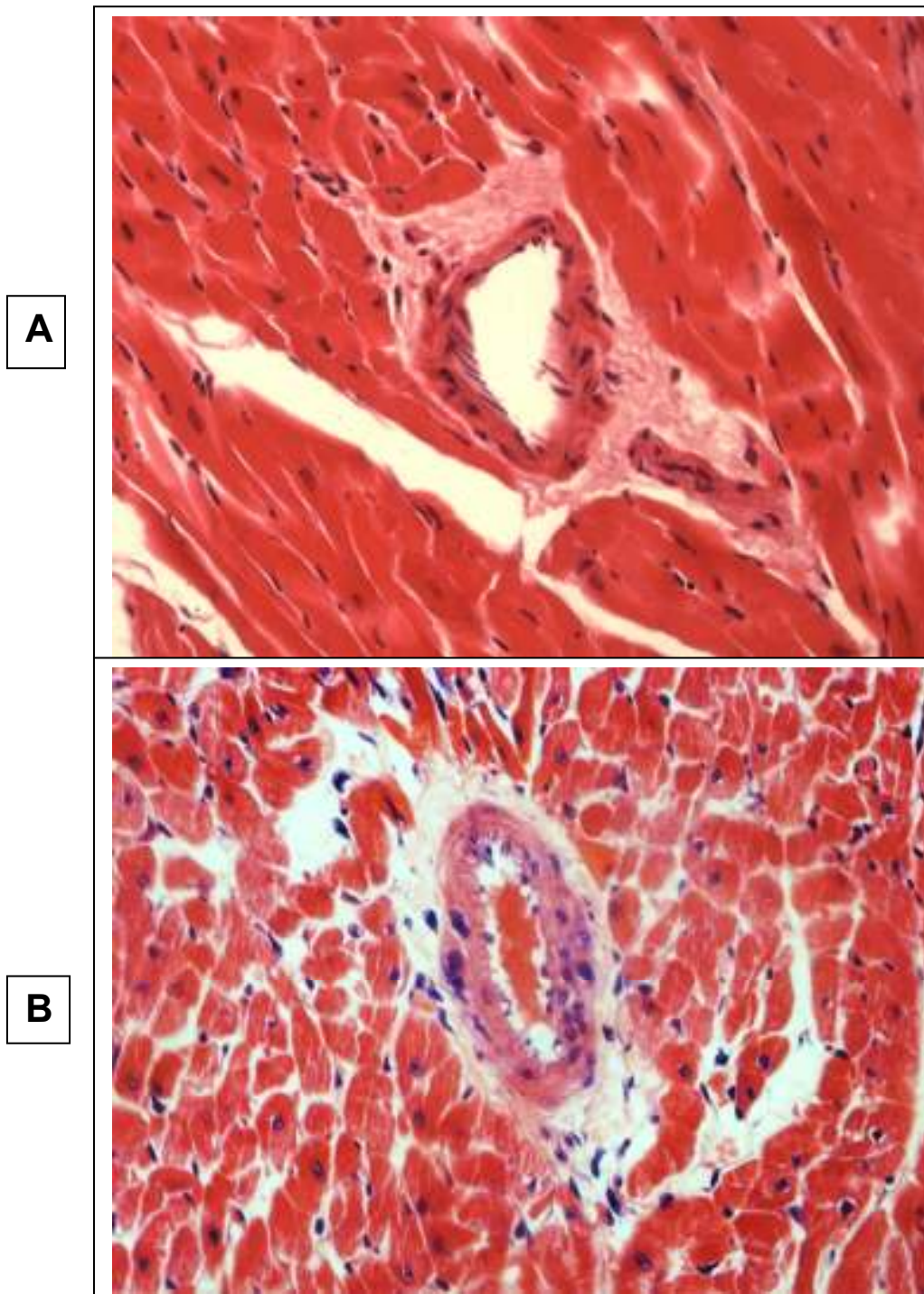
Essa hipertrofia observada em nossos animais pode ter contribuído para o aumento da duração do complexo QRS, desviando o eixo elétrico ventricular para a direita e colaborando para o prolongamento do intervalo QT nos animais tratados com monocrotalina. Tais resultados indicam alterações da atividade elétrica cardíaca, as quais podem estar associadas a prováveis disfunções contráteis. De fato, Xiaowei e David (2008), observaram que o quadro hipertrófico conseqüente à HAP induzida por monocrotalina acarretou disfunção endotelial em artérias coronárias induzindo remodelamento vascular e isquemia cardíaca. Assim, a vasoconstrição coronariana, observado no grupo MT, pode ter colaborado para o comprometimento da ativação elétrica ventricular desses animais e, provavelmente, alterado a função contrátil.

É importante notar que a hipertrofia cardíaca induzida por monocrotalina não implica em aumento da força de contração do coração, a qual seria necessária para manter a função cardíaca devido provavelmente, à redução da densidade de receptores adrenérgicos no modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina (Leineweber *et al.* 2002; Leineweber *et al.* 2003).

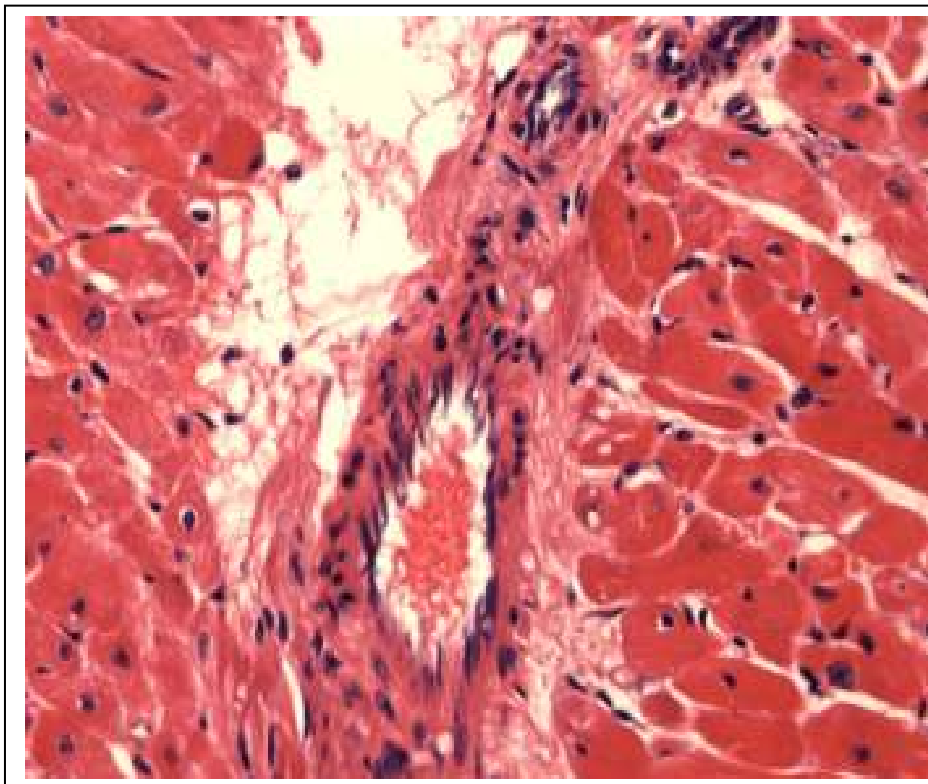
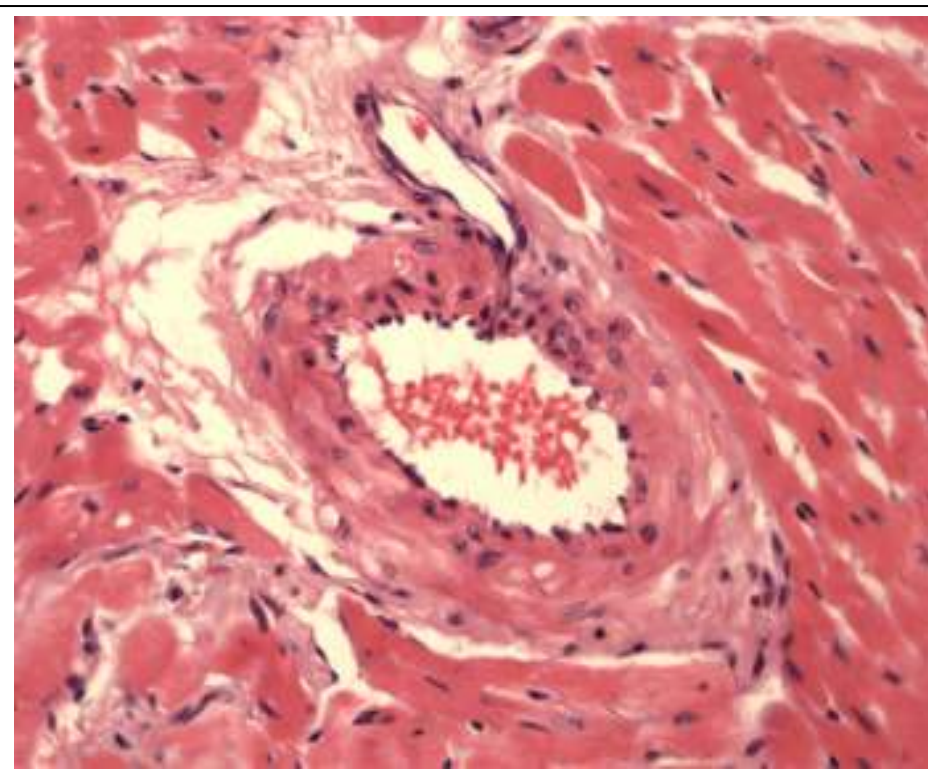
O tratamento com melatonina, por outro lado, preveniu tal comportamento vascular indesejado pela monocrotalina garantindo, assim, a oxigenação do músculo cardíaco preservando-o de prováveis alterações decorrentes de processos isquêmicos (**Tabela 2**).

<b>Grupos</b>	Artéria coronária Área túnica média em $\mu\text{m}^2$	Artéria coronária Área lúmen vascular em $\mu\text{m}^2$
Controle (C)	56.594	48.622.3
Controle melatonina (CML)	52.741 (ns)	44.812 (ns)
Monocrotalina (MT)	17.677 (*)	19.885 (*)
Monocrotalina+Melatonina (MTML)	51.877 (*)	50.882 (*)

**Tabela 2.** Mensuração da artéria coronária dos ratos dos grupos controle (CO), portadores de HAP (MT), controle melatonina (CML) e portadores de HAP tratados com melatonina (MTML) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey; ( $p < 0,05$  (\*) e (ns) não significativo: CO x CML (ns); C X MT (\*) e MT x MTML (\*); (n = 6).



**Figura 8.** Fotomicrografia de artéria cardíaca de ratos dos grupos controle (CO) (A) e do grupo controle melatonina (CML) (B). Observam-se núcleos íntegros dispostos periféricamente; túnica média e camada adventícia sem espessamento. HE. objetiva 40 X.

**A****B**

**Figura 9.** Fotomicrografia de artéria cardíaca de ratos dos grupos monocrotalina (MT) e monocrotalina+melatonina (MTML) portadores de HAP. Observam-se espessamento da adventícia, diminuição do lúmen vascular com obliteração e infiltrações leucocitárias (MT) núcleos íntegros dispostos periféricamente e lúmen vascular íntegro (MTML). HE. Objetiva 40 X.

#### 4.5. Histologia Pulmonar

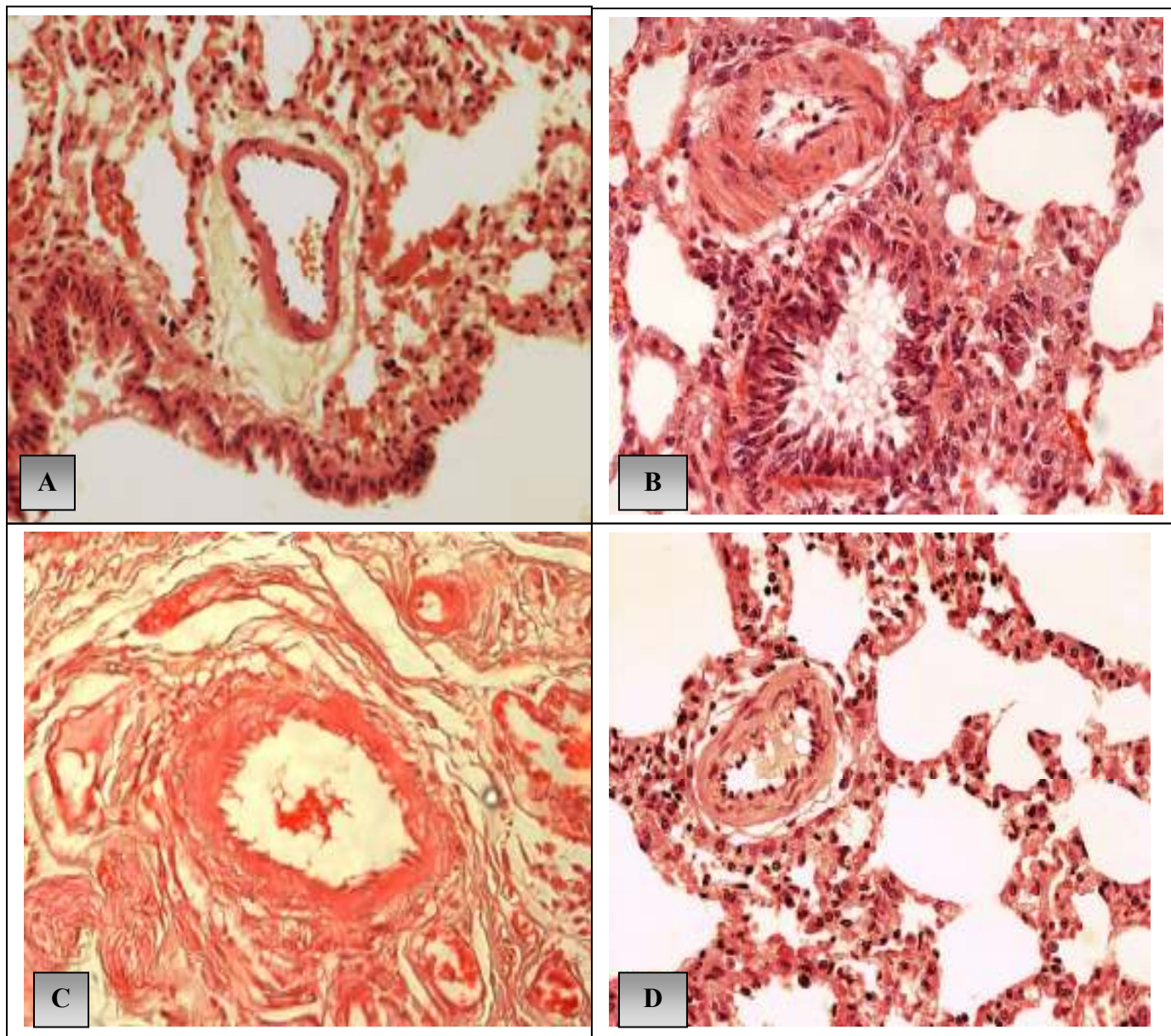
Os resultados da histologia dos pulmões (**Figura 10**) mostraram que o grupo MTML em relação ao MT, apresentou aumento significativo da área interna bem como redução da espessura da túnica média de artérias pré-acinares do parênquima pulmonar, evidenciando significativa redução da resistência vascular nos pulmões, contribuindo para melhorar os processos de troca de gases entre capilares e alvéolos pulmonares (**Tabela 3**).

De fato, aumento significativo da área alveolar observado no grupo MTML em relação ao MT, identifica maior capacidade de realizar a hematose, fato este que se apresenta reduzido no grupo MT, o qual apresenta maior proporção de tecido extra-alveolar em detrimento da área alveolar, caracterizando o quadro de HAP induzida por monocrotalina (**Figura 11**).

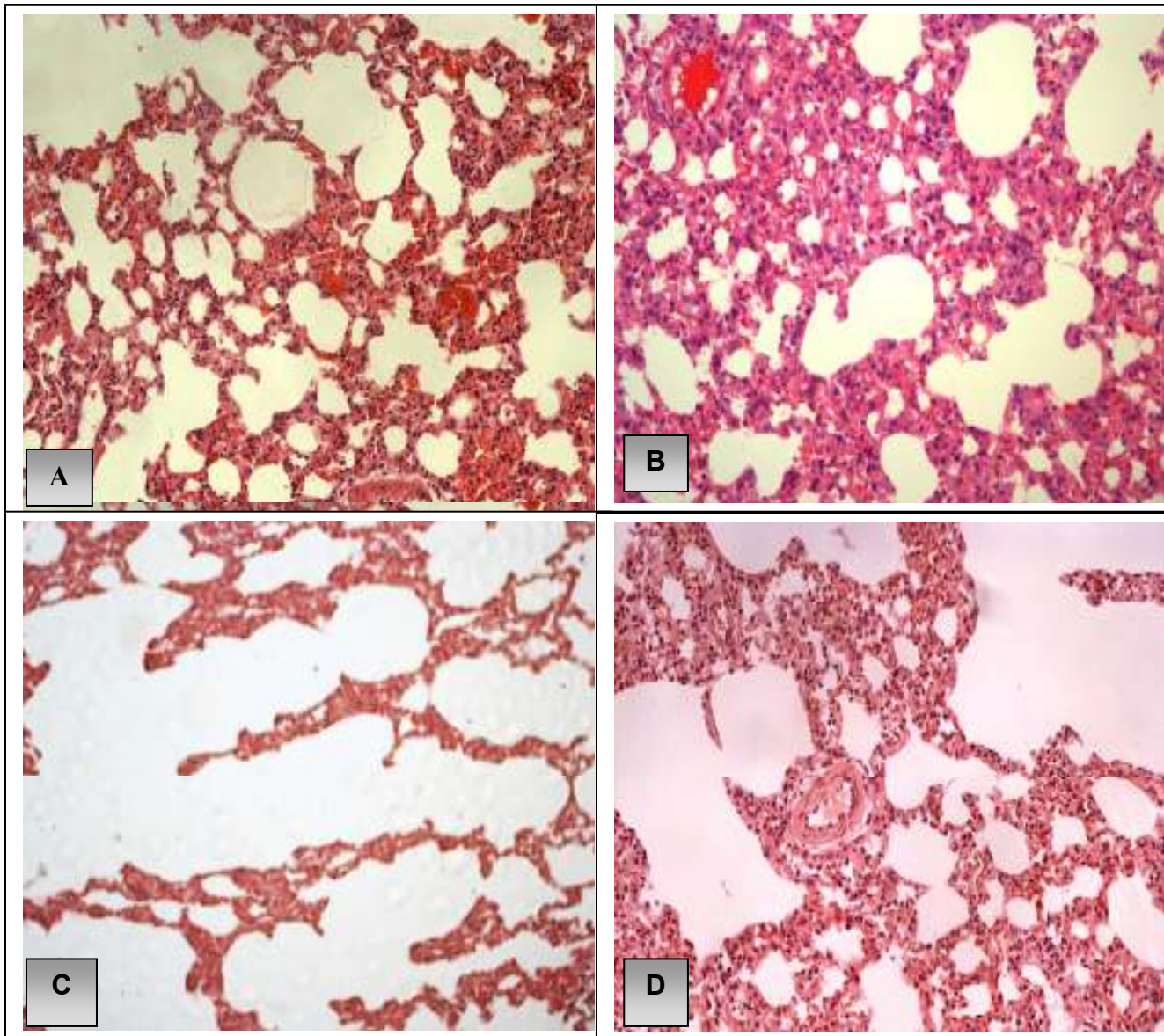
<b>Grupos</b>	Artéria pré-acinar Área túnica média em $\mu\text{m}^2$	Artéria pré-acinar Área lúmen vascular em $\mu\text{m}^2$
Controle ( <b>C</b> )	51.246.5	21.432.3
Controle melatonina ( <b>CML</b> )	33.135.5 (*)	20.686 (ns)
Monocrotalina ( <b>MT</b> )	79.174 (*)	13.360 (*)
Monocrotalina+Melatonina ( <b>MTML</b> )	42.264 (*)	25.370 (*)

**Tabela 3.** Medidas da artéria pré-acinar pulmonar dos ratos dos grupos controle (CO), portadores de HAP (MT), controle melatonina (CML) e portadores de HAP tratados com melatonina (MTML) ao final do período experimental (28 dias). A HAP foi induzida por administração de monocrotalina, dose única e subcutânea (60mg/Kg). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey; ( $p < 0,05$  (\*)) e (ns) não significativo: CO x CML; C X MT e MT x MTML; (n = 6).





**Figura 10.** Fotomicrografia de artéria pulmonar **(A)** grupo controle apresenta artéria com área interna de  $18.284 \mu\text{m}^2$ , núcleos celulares normais, espessura da túnica média íntegra; **(B)** grupo monocrotalina (60 mg/Kg de peso corpóreo), apresenta artéria espessamento da túnica média com área interna de  $11.216 \mu\text{m}^2$ , hipertrofia celular (setas) e diminuição do lúmen vascular; **(C)** grupo controle melatonina apresenta artéria com área interna de  $58.534 \mu\text{m}^2$  túnica média íntegra, preservação do lúmen vascular; **(D)** grupo monocrotalina+melatonina (60 mg/Kg de peso corpóreo, dose única) + (15 mg/Kg de peso corpóreo, dose diária/28 dias), apresenta artéria com área interna de  $24.509 \mu\text{m}^2$ , diminuição do espessamento da túnica média e aumento do diâmetro do lúmen vascular; H.E. objetiva 40x



**Figura 11.** Fotomicrografia do parênquima pulmonar (A) grupo controle (CO) apresenta área alveolar de  $501.453 \mu\text{m}^2$ , ducto alveolar, tecido extra-alveolar e alvéolos íntegros; (B) grupo monocrotalina (MT) (60 mg/Kg de peso corpóreo), apresenta área alveolar de  $424.199 \mu\text{m}^2$ , espessamento do tecido alveolar, hipertrofia nuclear, infiltração leucocitária; (C) grupo controle melatonina (CML) apresenta área alveolar de  $938.940 \mu\text{m}^2$ , tecido alveolar íntegro; (D) grupo monocrotalina+melatonina (MTML) (60 mg/Kg de peso corpóreo, dose única) + (15 mg/Kg de peso corpóreo, dose diária/28 dias) , apresenta área alveolar de  $625.354 \mu\text{m}^2$  diminuição do espessamento do parênquima e aumento do diâmetro do lúmen vascular; H.E. objetiva 20x

## 5. Conclusão

O tratamento com melatonina:

- a) reduziu significativamente a vasoconstrição de anéis da artéria pulmonar de ratos portadores de HAP;
- b) reduziu as alterações eletrocardiográficas de ratos portadores de HAP, diminuindo o alargamento do complexo QRS e o prolongamento do intervalo QT e, conseqüentemente, o risco de morte súbita;
- c) preveniu a redução da pressão arterial média dos ratos portadores de HAP, preservando a perfusão tecidual;
- d) preveniu a redução da área alveolar e, do lúmen vascular de artérias coronárias e pré-acinares pulmonares de animais portadores de HAP, preservando as trocas gasosas pulmonares e a irrigação cardíaca.

Concluindo, o tratamento com melatonina preveniu as alterações cardiovasculares e pulmonares conseqüentes à hipertensão arterial pulmonar.

Novos estudos se fazem necessários para esclarecer os mecanismos de ação da melatonina neste modelo experimental.

## 6. Perspectivas

### Hipótese de ação geral da melatonina

As células apresentam defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Dentre as defesas enzimáticas destacam-se as enzimas catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione redutase (GRd) e o conjunto das glutathione S-transferases (GSTs). As glutathione S-transferases, embora não atuem diretamente contra os radicais livres, são importantes na defesa celular, pois estão associadas à biotransformação de xenobióticos, como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos.

A melatonina é capaz de atuar na regulação da expressão gênica das seguintes enzimas ativando-as: superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GRd), glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6PDH) (TAN *et al.*, 2000-2002; REITER *et al.*, 2000b-2001b-2002; BAYDAS *et al.*, 2002). Essa molécula também pode inibir enzimas pró oxidantes como óxido

nítrico sintase (NOS), lipoxigenases (5-LPO) e ciclooxigenase (COX) (PAPPOLLA *et al.*, 2001; REITER *et al.*, 2001b).

Assim, pretendemos, futuramente, avaliar as propriedades antioxidantes da melatonina analisando as enzimas antioxidantes bem como o seu provável efeito anti-apoptótico neste modelo experimental.

## 7. Bibliografia

1. Abete P, Bianco S, Calabrese C, Napoli C, Cacciatore F, Ferrara N, Rengo F. Effect of melatonin in isolated rat papillary muscle. **FEBS Letters**. 1997; 412: 79-85.
2. Anwar MM, Meki AR, Rahma HH. Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 2001; 130(3):357-67.
3. Antolin I, Rodriguez C, Sainz R M, Mayo J C, Uria H, Kotler M L, Rodriguez-Colunga M J, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. **FASEB J** 1996; 10: 882-890.
4. Baltatu O, Afeche SC, Dos Santos SHJ, Campos LA, Barbosa R, Michelini LC, Bader M, Cipolla-Neto J. Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. **J Neurochem**. 2002; 80: 328-334.
5. Barreto A C. Avaliação não invasiva de pacientes com hipertensão arterial pulmonar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2005; v 85: 147-154.
6. Baydas G, Reiter, R J, Nedzvetskii V S, Nerush P A, and Kirichenko S V. **J Pineal Res**. 2002; 33, 134-139.
7. Barlow-Walden L R, Reiter R J, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen L D, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem Int**. 1995; 26: 497-502.
8. Bossone E, Butera G, Bodini BD, Rubenfire M. The interpretation of the electrocardiogram in patients with pulmonary hypertension: the need for clinical correlation. **Heart J**. Dec. 2003; 4(12): 850-4.
9. Brydon L, Roka F, Petit L, De Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan P J, Nanoff C, Strosberg A D, Jockers R. Dual signaling of human Mel1a

- melatonin receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 proteins. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 2025-2038.
10. Brodde O E & Michel M C., Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol Ver.**, 1999; 51 (4): 651-689.
11. Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C., Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 1998; 31: 108-115.
12. Bruner L H, Hilliker K S, Roth R., Pulmonary Hypertension and ECG changes from monocrotaline pyrrole in the rat. **Am J Physiol.**, 1983; H300-H306.
13. Bromme HJ, Morke W, Peschke D, Ebelt H, Peschke D: Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. **J Pineal Res** 29: 201-208, 2000.
14. Cabrini F P H. Implantação do modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em ratos: avaliação eletrocardiográfica. **<http://libdigi.unicamp.br/document/code=000443360>**. 2009.
15. Capsoni S, Viswanathan M, De Oliveira A M, Saavedra J M. Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. **Endocrinology**. 1994; 135: 373-378.
16. Chen E P, akhter S A, Bittner H B, Koch W J, Davis R D, Trigt P V., Molecular and funcional mechanisms of right ventricular adaptation in chronic pulmonary hypertention. **Ann Thorac Surg.**, 1999; 67: 1053-1058
17. Chen L, Gan X T, Haist J V, Feng Q, Lu X, Chakrabarti S, Karmazyn M.,

- Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na-H Exchange inhibitor cariporide. **J Pharmacol and Experimental Therapeutics**. 2001; 298 (2): 469-476.
18. Chen S J, Chen Y F, Opgenorth, T J, Wessale J L, Meng Q C, Durand J, DiCarlo, V S, Oparil S., The orally active nonpeptide endothelin A-receptor antagonist A 127722 prevents and reverse hypoxia-induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in sprague-dawley rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 1997; 29(6): 713-725.
19. Cheeke P.R., A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. **Vet. Human Toxicol**. 1994; 36:240-247.
20. Cheeke P.R. Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants. 2nd ed. **Interstate, Danville, Illinois**. 1998; 479p.
21. Chu V, Otero JM, Lopes O, Morgan JP, Amende I and Hampton PG Method non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. **BMC Physiology**, 2001; 1: 1-12.
22. Costa, E.J.X.; Lopez, R.H.; Lamy-Freund, M.T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **J Pineal Res**. 1995; v.19, p.123-126.
23. Costa ECS, Gonçalves AA, Areas MA, Morgabel RGB. Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc de ratos diabéticos. **Arq Bras Cardiol** 2008; 90(4): 232-238.
24. Coats A J S, Adamapolus S, Radelli A, McCance A, Meyer T E, Bernardi L, Solda P L, Davey P, Ormerod O, Forfar C, Conway J, Sleight P.

- Controlled trial the physical training in heart failure. **Circulation** 1992; 85: 2119-31.
25. Das R, Balonan L, Ballard HJ, Ho S, Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery. **International Journal of Cardiology** 2008; 340-345.
26. Demuro R L, Nafziger A N, Blask D E, Menhinick A M, Bertino J S JR: The absolute bioavailability of oral melatonin. **J Clin Pharmacol.** 2000; 40: 781-784.
27. Dhein S, Giessler C, Hoffmann I H, Leineweber K, Seypharth t, Brodde O E, Changes in  $\alpha$ -1 adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. **Naun Sch Arch Pharmacol.** 2002; 365: 87-95.
28. Dixon J, Duc J, Ashen D, Nábauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF., Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. **Circulation.** 1998; Oct 6; 98 (14):1383-93.
29. Dubocovich ML, Cardinali DP, Guardiola-Lemaitre B, Hagan RM, Krause DN, Sugden D, Vanhoutte PM, Yocca FD: Melatonin receptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification. **IUPHAR Media**, London, 1998; pp 187-193.
30. Duncan M J, Takahashi J S, Dubocovich M L. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. **Endocrinology.** 1989; **125**: 1011-1018.
31. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, Leibetseder VJ, Thalhammer T, Marktl W: Expression of the MT1



- melatonin receptor subtype in human coronary arteries. **J Recept Signal Transduct Res.** 2001; 21: 85-91.
32. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi M R, Glogar H D, Holzenbein T H, Markovic O, Leibetseder V J, Strauss-Blasche G, Marktl W. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. **J Pineal Res.** 2003; 35: 40-44.
33. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical relevance. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** 2006 April; 60 (3); 97-108.
34. Favret F, Henderson K K, Allen J, Richalet J P, Gonzalez N C. Exercise training improves lung gas exchange and attenuates acute hypoxic pulmonary hypertension but does not prevent pulmonary hypertension of prolonged hypoxia. **J Appl Physiol.** 2001; 100: 20-25.
35. Folino AF, Bobbo F, Schiraldi C, Tona F, Romano S, Buja G, Bellotto F., Ventricular arrhythmias and autonomic profile in patients with primary pulmonary hypertension. **Lung.**, 2003; Nov-Dec;181(6):321-8
36. Furchgott RF & Zawadzki JV., The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth by acetylcholine. **Nature.** 1980; 288: 373-376.
37. Geary GG, Duckles SP, Krause DN. Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K<sup>+</sup> channels and endothelial factors. **Br J Pharmacol** 1998; 123(8):1533-40.
38. Girouard H, Chulak CH, Lejossec M, Lamontagne D, De Champlain J: Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** 2001; 19: 1369-1377.
39. Girouard H, Chulak CH, Lejossec M, Lamontagne D, De Champlain J:

- Chronic antioxidant treatment improves sympathetic functions and  $\beta$ -adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens.** 2003; 21: 179-188.
40. Girouard H, Denault C, Chulak C, De Champlain J: Treatment by N-acetylcysteine and melatonin increases cardiac baroreflex and improves antioxidant reserve. **Am J Hypertens** 2004; 17: 947-954.
41. Gitto E, Tan D X, Reiter R J, Karbownik M, Manchester L C, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. **J Pharm Pharmacol.** 2001; 53: 1393-1401.
42. Goret I, Reboul C, Tanguy S, Dautzat M, Obert P. **Eur. J. Pharmacol** 2005; 527: 121-128.
43. Gout B, Quiniou M J, Khandoudi N, Dantec C L, Saiag B., Impaired endothelium-dependent relaxation by adrenomedullin in monocrotaline-treated rat arteries. **Eur J Pharmacol.**, 1999; 380: 23-30.
44. Guimarães, JI. Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Pulmonar – **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2005; 1-182.
45. Guven O, Farzin P, Ayur Y, Assim K C. Giant carcinoid tumor mimicking pulmonary sequestration. **The annals of thoracic surgery.** 2007; 84(4): 1375-1376.
46. Hardeland R, Pandi-Perumal S R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent,

- gastrointestinal factor, drug and prodrug. **Nutrition & metabolism**, 2005; 20-22.
47. Henkens IR, Mouchaers KT, Vliegen HW, van der Laarse WJ, Swenne CA, Maan AC, et al., Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2007; 293:H1300-7.
48. Henkens IR, Mouchaers KT, Vonk-Noordegraaf A, Boonstra A, Swenne CA, Maan AC, et al. Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular pressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging., **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2008; 294:H2150-7.(A).
49. Henkens IR, Scherptong, RWC, van Kralingen, KW, Said, SAM, Vliegen, H.W., Pulmonary hypertension: the role of the Electrocardiogram. **Neth Heart J**. 2008; 16:250-4. (B).
50. Hessel M H M, Steendijk P, Adel B d, Scutte C I, Laarse A v d., Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**., 2006; 291: H2424-H2430.
51. Hoelz C, Negri EM, Lichtenfels AJ, Conceição GM, Barbas CS, Saldiva PH, Capelozzi VL., Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and secondary ARDS. A preliminary study in autopsies. **Pathol Res Pract**., 2001; 197(8):521-30
52. Hongo M, Mawatari E, Sakay A, Ruan Z, Koizumi T, Terasawa F, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U, Shibamoto T., Effects of nicorandil on

- monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 2005; 46: 452-458.
53. Ito K., Hayashi K., Nakashima T., Murakami T. Alteration of fate of vasoactive autacoids in pulmonary circulation following monocrotaline-induced lung vascular injury in rats. **Br J Pharmacol.** 1988; August; 94(4): 1167–1174.
54. Ito K M, Sato M, Ushijima K, Nakai M, Ito K. Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2000; 279: H1786-H1795.
55. Ivo R. Henkens,<sup>1</sup> Koen T. B. Mouchaers,<sup>2</sup> Anton Vonk-Noordegraaf,<sup>2</sup> Anco Boonstra,<sup>2</sup> Cees A. Swenne,<sup>1</sup> Arie C. Maan,<sup>1</sup> Sum-Che Man,<sup>1</sup> Jos W. R. Twisk,<sup>3</sup> Ernst E. van der Wall,<sup>1</sup> Martin J. Schalij,<sup>1</sup> and Hubert W. Vliegen<sup>1</sup>., Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular mpressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2008; 294: H2150–H2157.
56. Ishikawa K, Hashimoto H, Mitani S, Toki Y, Okumura K, Ito T. Enalapril improves heart failure induced by monocrotaline without reducing pulmonary hypertension in rats: roles of preserved myocardial creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzymes. **Int. J. Cardiol.** 1995; 47: 225-233.
57. Ianas O, Olinescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. **Endocrinologie** 1991; 29: 147-153.

58. Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P, Buijs RM: Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. **Eur J Neurosci.**, 2000; 12: 3146-3154.
59. Kääb Galiè N, Rubin LJ, eds. Pulmonary arterial hypertension. Epidemiology, assessment, and therapy. **JACC.** 2004; 43(Suppl S):1S-90S.
60. Karliner JS, Sarnquist FF, Graber DJ, Peters RM Jr., West JB., The electrocardiogram at extreme altitude: experience on Mt. Everest. **Am Heart J.**, 1985; 109:505-13.
61. Kanno S, Wu Y, Lee P C, Billiar T R, Ho C. Angiotensin-converting inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circulation** 2001; 104: 945-950.
62. Kennaway DJ and Voultsios A: Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. **J Clin Endocrinol Metab.** 1998; 83: 1013-1015.
63. Kiran T R, Subramanyam M V V, Devi S., Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. **Comparative Bioch and Physiol Part B.**, 2004; 137: 187-196.
64. Klein DC, Sugden D, Weller JL: Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1983; 80: 599-603.
65. Kim H.Y., Stermitz F.R., Wilson D.W., Taylor D. & Coulombe Jr R.A. Characterization of pyrrolizidine alkaloids-induced DNA-protein cross-link.

- Carcinogenesis** 1993; 16:2691-2697.
66. Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen VP, Schott P, Brodde OE, and Hasenfuss G., Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. **Circ Res.** 2003; 93: 230–237.
67. Kokkola T, Vaitinen M, Laitinen J T. Inverse agonist exposure enhance ligand binding and G protein activation of the human MT1 melatonin receptor, but leads to receptor down-regulation. **J Pineal Res.** 2007 Oct; 43(3): 255-262.
68. Kumar S, Kela AK, Mehta VL and Shukla AK., Preferred anesthetics agents in experimental cardiology: a study on rat electrocardiogram. **Ind. J. Pharmacol.** 1995; 23: 127-129.
69. Lamberts R R, Vaessen R J, Westerhof N, Stienen G J M., Right ventricular hypertrophy causes impairment of left ventricular diastolic function in the rat. **Basic Res Cardiol.** 2007; 102: 19-27.
70. Leineweber K, Seyfarth T, Brodde O E., Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake<sub>1</sub>) in right ventricles of monocrotaline-treated rats. **British J Pharmacol.** 2000; 131: 1438-1444.
71. Leineweber K, Seyfarth T, Abraham G, Gerbershagen HP, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde OE., Cardiac beta-adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. **J Cardiovasc Pharmacol.** 2003; Mar; 41(3):333-42.
72. Lewis M, Fladers S. Mechanism of melatonin-induced vasoconstriction in

- rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction. **Br J Pharmacol.** 1999; 126:1408-18.
73. Lourenço A P, Albuquerque R R, Silva C B, Faria B, Wieland J, Coelho T H, Pinto J C, Moreira A F L., Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling em left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Am J Psysiol Heart Circ Physiol.**, 2006; 291: 1587-1594.
74. Luz P L, Laurindo F R M e Chagas A C P. *Endotélio: doenças cardiovasculares.* 2003.
75. Macchi M M, Bruce J N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Neuroendocrinal.** 2004, Sep-Dec; 25(3-4): 177-195.
76. Marleen H. M. Hessel, Paul Steendijk, Brigit den Adel, Cindy I. Schutte, and Arnoud van der Laarse., Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2006; 291: H2424–H2430.
77. Malpoux B, Skinner D C, Maurice F. The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. **J Neuroendocrinol** 1995; 7: 199-206.
78. Malpoux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. **J Biol Rhythms.** 2001; 16: 336-347.
79. Masana M I, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul W M, Duckles S P,

- Dubocovich M L, Krause D N. MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. **J Pharmacol Exp Ther.** 2002; 302: 1295-1302.
80. Mattocks A R. Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. **Academic Press.** London. 1986; 393p.
81. Mawatari E, Hongo M, Sakai A, Terasawa F, Takahashi M, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U., Amlodipine prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats independent of blood pressure lowering. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2007; 34(7):594-600.
82. Mereles D, Ehlken N, Kreuzer S, Ghofani S, Hoeper M. M. Exercise and respiratory exercise improve capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. **Circulation.** 2006; 114:1482-89.
83. McLaughlin V V & McGoon M D., Pulmonary arterial hypertension. **Circulation.** 2006; 114: 1417-1431.
84. McGoon M, Gutterman D, Steen V, Barst R, McCrory DC, Fortin TA, et al., Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest** 2004; 126:14S-34S.
85. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yanu M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K., Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with



- monocotaine-induced pulmonary hypertension. **Circ Res.**, 1993; 73: 887-897.
86. Morita K M D, Ogawa Y M D, Tobise K M D., Effect of endothelium of pulmonary artery vasoreactivity in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Jpn Circ J.**, 1996; 60: 585-592.
87. Moore RY: Neural control of the pineal gland. **Behav Brain Res** 1996; 73: 125-30.
88. Mor M, Plazzi PV, Spadoni G, Tarzia G: Melatonin. **Curr Med Chem.** 1999; 6: 501-518.
89. Nelson C S, Marino J L, Allen C N. Melatonin receptors activates heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. **Neuroreport** 1996; 7: 717-720.
90. Newby AC, Zalstman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. **J Pathol.** 2000; 190:300-309.
91. Newman J H, Robbins I M., Exercise training in pulmonary hypertension: implications for the evaluation of drugs trial. **Circulation.** 2006; 1448-1449.
92. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Helin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E, Boutin JA., Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **J Biol Chem.** 2000; 275: 31311-31317.
93. Nishiyama K, Yasue H, Moriyama Y, Tsunoda R, Ogawa H, Yoshimura M & Kugiyama K. Acute effects of melatonin administration on

- cardiovascular autonomic regulation in healthy men. **Am Heart J.** 2001; 141, E9.
94. Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J Pineal Res.** 1999; 27: 159-163.
95. Oriowo M A, Chandrasekhar B, Kadavil E.,  $\alpha$  1 adrenoceptor subtypes mediating noradrenaline-induced contraction of pulmonary hypertensives rats. **Eur J Pharmacol.**, 2003; 482: 255-263.
96. Pappolla M A, Poeggeler B, Reiter R J. La hipótesis oxidativa en la enfermedad de Alzheimer. Papel de la melatonina como antioxidante y como agente antibeta amiloide. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, 2001; v.8, p.8-19.
97. Paulis L, Važan R, Šimko F, Pecháňová O, Styk J, Babál P, Janega P. Morphological alterations and NO-synthase expression in the heart after continuous light exposure of rats. **Physiol Res.** 2007; 56 (Suppl 2), in press.
98. Pelá G, Missale C, Raddino R, Condorelli E, Spano P F, Visioli O J.,  $\beta$ - 1 and  $\beta$ -2 Receptors are differentially desensitized in the experimental model of heart failure. **Cardiovasc Pharmacol.** 1990; 839-846.
99. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci.** 1994; 55: PL271-PL276.
100. Pogan L, bissonnette P, Parent L, Sauve R: The effects of melatonin on Ca<sup>2+</sup> homeostasis in endothelial cells. **J Pineal Res.** 2002; 33: 37-47.
101. Post J M, Hume J R, Archer S L, Weir K., Direct role for potassium

- channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Cell Physiol.** 1992; 31: C882 – 890.
102. Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. **Clin Chest Med.** 2001; 22:433-449.
103. Rabinovitch M. Pulmonary hypertension: pathophysiology as a basis for clinical decision making **J Heart Lung Transpl.**, 1999; 18:1041-1052.
104. Ray C.A. Melatonin attenuates the sympathetic nerve responses to orthostatic stress in humans. *J Physiol.*, 2003; 551.3 pp. 1043-1048.
105. Reiter R.J. Antioxidant actions of melatonin. **Adv Pharmacol** 1997; 38:103-17.
106. Reiter R J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr Rev.** 1991; 12: 151-180.
107. Reiter RJ, Ortiz GG, Monti MG, Carneiro RC: Cellular and Molecular Actions of Melatonin as an Antioxidant. **Horm Res. Basel, Karger**, 1997, vol 23, pp 81-88.
108. Reiter R J, Tan D X, Ouna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal Biomed Science.** 2000a; (7): 444-458.
109. Reiter R J, Tan D X, Qi W, Manchester L C, Karbownik M, Calvo J R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. **Biological Signals and Receptors.** 2000b; (9): 160-171.
110. Reiter R J, Tan D X, Manchester L C, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. **Cell biochemistry and biophysics.** 2001; 34(2): 237-56.
111. Reiter, R.J., Tan, D. X.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Lopez-Burillo, S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. **J. Pharm. and Pharmacol.** 2002; 54: 1299-1321.

112. Reiter RJ, et al. Medical implications of melatonin: receptors-mediated and receptors-independent actions. *Adv. Med. Sci.* 2007; 52: 11-28.
113. Reppert, S. M.; Weaver, D. R.; Ebisawa, T. Cloning and characterization of mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. **Neuron**, 1994; 13(5): 1177-1185.
114. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mawe CD, Kolakowski LF. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. **FEBS Letters** 1996; 386 (2-3): 219-224.
115. Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V: Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. **Brain Res** 1997, 777: 247-501.
116. Rosenberg H. C. e Rabinovitch M., Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 1988; 255: H1484 – H1491.
117. Said, Sami I., Mediators in modulators of pulmonary hypertension. **Am J Physiol Cell Mol Physiol.**, 2006; 291: L547-L558.
118. Santos JCA, Riet-Correa F, S, Simões SVD, Barros SL. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 2008; 28(1): 1-14, janeiro.
119. Sanyal S N, Ono K., Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. **Pathophysiology**, 2002; 8: 197-203.
120. Sahna E, Parlakpınar H, Öztürk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Urol Res.** 2003; 31: 188-93.
121. Schott P, Singer SS, Kogler H, Neddermeier D, Leineweber K,

- Brodde OE, Regitz-Zagrosek V, Schmidt B, Dihazi H, and Hasenfuss G., Pressure overload and neurohumoral activation differentially affect the myocardial proteome. **Proteomics**, 2005; 5: 1372–1381.
122. Seyfarth T, Gerbershagen H P, Giessler C, Leineweber K, Hoffmann I H, Ponicke K, Brodde O E., The cardiac  $\beta$  adrenoceptor- G-protein(s)-adenylyl cyclase system in monocrotaline-treated rats. **J Mol Cell Cardiol.**, 2000; 32: 2315-2326.
123. Sewerynek E, Reiter R J, Melchiorri D, Ortiz G G, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. **Hepatogastroenterology** 1996; 43: 898-905.
124. Schermuly R T, Kreisselmeier K P, Ghofrani H A, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrat D, Seeger W, Grimminger F., Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Am J Respir Crit Care Med.**, 2004; 169:39-45.
125. Shibata S, Satake N, Takagi T, Usui H: Vasorelaxing action of melatonin in rabbit basilar artery. *Gen Pharmacol* 1989; **20**: 677-680.
126. Shubat P J, Bowers R J and Huxtable R J.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - Adenosine Triphosphatase activity of pulmonary arteries after intoxication with the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. **J Pharmacol Exp Ther.**, 1989; 252: 70-76.
127. Spinale FG, Gunasinghe H, Sprunger PD, Baskin JM, and Bradham WC., Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and

- progression to heart failure. **J Card Fail.** 2002; S332–S338.
128. Steinber G, Susan F.,  $\alpha$  1-adrenergic receptor subtype function in cardiomyocytes: lessons from genetic models in mice. **J Mol Cell Cardiol.**, 2002; 34: 1141-1145.
129. Sun X e Ku D.D., Selective right, but not left, coronary endothelial dysfunction precedes development of pulmonary hypertension and right heart hypertrophy in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2005; 290: H758 – H764.
130. Tan D X, Manchester L C, Reiter R J; Qi W; Kim S J; El-Sokkary G H. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. **Journal of pineal research** 1998; 25(3):184-91.
131. Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F, Limson J, Weintraub S T, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. **Free radical biology & medicine.** 2000; 29(11):1177-85.
132. Tan D X, Manchester L C, Burkhardt S, Sainz R M, Mayo J C, Kohen R, Shohami E, Huo Y S, Hardeland R, Reiter R J. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.** 2001; 15(12):2294-6.
133. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, and Reiter RJ., Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and

- significance. **Journal of pineal research** 2007 Nov; 43 (4): 317-20,
134. Taylor D W, Wilson D W, Lamé M W, Dunston S D, Jones A D, Segall H J., Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 1997; 143: 196-204.
135. Tagaya E, Tamaoki J, Kawatani K, Nagai A. Role of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase in sodium-nitroprusside induced relaxation of pulmonary artery under hypoxia. **Respiration**, 2001; 68: 186-191.
136. Tenganntini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, and Rezzani R., Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. **J Pineal Res.** 2008; 44: 16-25.
137. Ting N, Thambyraja A, Sugden D, Scalbert E, Dela P, Wilson VG, Pharmacological studies on the inhibitory action of melatonin and putative melatonin analogues on porcine vascular smooth muscle. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 2000; 361: 327-333.
138. Thomas H C, Lamé M W, Dunston S K, Segall H J, Wilson D W., Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 1998; 151: 236-244.
139. Tuder RM et al. The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. (2001) **Clin Chest Med.**, 22:405-418.
140. Tuder RM, et al. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension, **Am J Pathol.** 1994; 144:275-285.
141. Turjanski AG, Estrin DA, Rosenstein RE, McCormick JE, Martin SR, Pastore A, Biekofsky RR, Martorana V: NMR and molecular dynamics

- studies of the interaction of melatonin with calmodulin. **Protein Sci.** 2004; **13**: 2925-2938.
142. Usui S, Yao A, Hatano M, Kohmoto O, Takahashi T, Nagai R, Kinugawa K., Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. **Circ J.** 2006 Sep; 70(9):1208-15.
143. Uchino T, Shamarendra N, Sanyal NS, YAMABE M, KAKUI T, Takebayashi S, Shimaoka T, Shimada T, Noguchi T, and ONO, K., Rescue of Pulmonary Hypertension with an Oral Sulfonamide Antibiotic Sulfoxazole by Endothelin Receptor Antagonistic Actions. **Hypertens Res.** 2008; Vol. 31, N° 9.
144. Van der Laarse A., Hypothesis: troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. **Cardiovasc Res.** 2002; 56: 8–14.
145. Vaneček J, Pavlík A, Illnerová H: Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. **Brain Res.** 1987; 435: 359-362.
146. Vaneček J, inhibitory effect of melatonin on GnRH-induced LH release. **Review of reproduction** 1999; 4: 67-72.
147. Velez-roa S, Ciarka A, Najem B, Vachier J L, Naeiji R, Borne P V., Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. **Circulation.** 2004; 110: 1308-1312.
148. Verzola, R M M, Mesquita R A, Peviane S, Ramos O H P, Moriscot A S, Perez S E A, Araújo H S S., Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swimming training. **Braz J Med Biol Res.**, 2006; 39(35): 621-



- 627.
149. Viswanathan M, Laitinen J T, Saavedra J M: Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87: 6200-6203.
150. Vogel J, Morbius C, Kushinsky W, Rosblun WI. Early delineation of ischemic Tissue in Rat Brain cryosections by high-contrast staining. **Stroke, Journal of American heart Association.** 1999; 30 (5): 1134-41.
151. Xiaowei Sun and David D. Ku., Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2008; 294: H801–H809.
152. Xiaohong CL, Gan T, Haist JV, Feng Q, Lu X, Chakrabarti S, and Karmazyn M., Attenuation of compensatory right centricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide. **Journal Phisiol. Exp. Ther.** 2001; 298:469–476.
153. Wang F, Li J, Wu C, Yang J, Xu F, Zhao Q: The GABA<sub>A</sub> receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, 2003; 74: 573-578.
154. Werchan P M, Summer W R, Gerdes A M, Mcdonough K H., Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Heart Circ Physiol.**, 1989; 25: H1328-H1336.
155. Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, and McDonough KH., Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary

- hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 1989; 256: H1328–H1336.
156. Williams L M, Morgan P J. Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. **J Endocrinol.** 1988; 119: R1-R3.
157. Yan C C, Huxtable R J. Relationship between glutathione concentration and metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, in the isolated, perfused liver. **Toxicol Appl Pharmacol.**, 1995; Jan; 130 (1):132-9.
158. Witt-Enderby P A, Dubocovich M L. Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. **Mol Pharmacol.** 1996; **50**: 166-174.
159. Wurtman RJ, Axelrod J, Chu EW: The relation between melatonin, a pineal substance, and the effects of light on the rat gonad. **Ann N Y Acad Sci** 1964; 117: 228-230.
160. Zanichelli P G, Estrela H F G, Spadari-Bratfisch R C, Grassi-Kassisse D M, Franco D W. The effects of ruthenium tetraammine compounds on vascular smooth muscle. **Nitric oxide** 2007; 6: 189-196.
161. Zanichelli P G, Miotto A M, Estrela H F G, Soares F R, Grassi-Kassisse D M, Spadari-Bratfisch R C, Castellano E E, Roncaroli F, Parise A R, Olabe J A, de Brito A R, Franco D W., The [Ru(Hedta)Na] (0.1) System: structure chemical reactivity and biological assays. **J. Inorg. Biochem.** 2004; 98: 1921-1932.



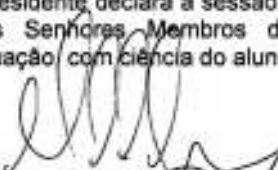
**Ata da sessão pública de defesa da dissertação para obtenção do título de MESTRE em BIOLOGIA FUNCIONAL E MOLECULAR na Área de FISILOGIA, a que se submeteu o aluno LUIZ ALBERTO FERREIRA RAMOS, RA 037933, orientado pelo PROF. DR. MIGUEL ARCANJO AREAS.**

Aos vinte e três dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dez, às 14:00 horas, na Sala de defesa de Tese, Prédio da Pós-Graduação do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo Senhor Diretor do Instituto de Biologia, composta pelos Professores Doutores: MIGUEL ARCANJO AREAS (Presidente e Orientador), Professor Doutor do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, DORA MARIA GRASSI KASSISSE, Professor Doutor do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP e FELIX GUILLERMO REYES REYES, Professor Titular do Departamento de Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, para analisar o trabalho do candidato LUIZ ALBERTO FERREIRA RAMOS, apresentado sob o título: "EFEITO DA MELATONINA SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM RATOS PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA". O Presidente declarou abertos os trabalhos, a seguir o candidato dissertou sobre o seu trabalho e foi arguido pela Comissão Julgadora. Terminada a exposição e a arguição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:


- APROVADO**       **APROVADO CONDICIONALMENTE** (ao atendimento das alterações sugeridas pela Comissão Julgadora especificadas no parecer anexo).
- REPROVADO** (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora).

Para fazer jus ao título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na Área de Fisiologia a versão final da dissertação, considerada Aprovada ou Aprovada Condicionalmente devidamente conferida pela CPG da Unidade, deverá ser entregue à CPG dentro do prazo de 60 dias, a partir da data da defesa. De acordo com o previsto na Deliberação CONSU-A8/08, Artigo 35, parágrafo 1º, inciso II e parágrafo 2º, o aluno Aprovado Condicionalmente que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Comissão Central de Pós-Graduação da UNICAMP, conferindo título de validade nacional aos aprovados.


Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente declara a sessão encerrada, sendo a ata lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pela Coordenadora da Comissão de Pós-graduação, com ciência do aluno.

  
Presidente da Comissão Julgadora  
PROF. DR. MIGUEL ARCANJO AREAS (Orientador)

  
PROFA. DRA. DORA MARIA GRASSI KASSISSE

  
PROF. DR. FELIX GUILLERMO REYES REYES

PROF. DR. HIROSHI AOYAMA  
Coordenador Substituto da CPPG-BFM

  
ANDRIELA APARECIDA VIGILATO DOS SANTOS  
Secretaria de Pós-graduação

Ciência do aluno: LUIZ ALBERTO FERREIRA RAMOS



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 1647-1, sobre "Efeitos da melatonina sobre parâmetros cardiovasculares, bioquímicos e morfológicos em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzido por monocrotalina", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas / Luiz Alberto Ferreira Ramos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 10 de outubro de 2008.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1647-1, entitled "The melatonin effects on cardiovascular parameters, biochemical and morphological by monocrotaline induced rats with pulmonary arterial hypertension", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 10, 2008.

Campinas, 10 de outubro de 2008.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva



UNICAMP

# Universidade Estadual de Campinas

A Universidade Estadual de Campinas, de acordo com a Resolução GR N° 34, de 21-08-2007, certifica que,

**Luiz Alberto Ferreira Ramos**

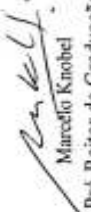
Brasileiro, natural do Estado de São Paulo, nascido a 05 de maio de 1960, RG: 14468754-9-SP

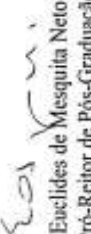
do curso de **Mest. em Biologia Funcional e Molecular**

participou do Programa de Estágio Docente – PED, no Grupo C - Atividades de Apoio à Docência Parcial sob supervisão, no primeiro período letivo de 2009, com dedicação de 08 (oito) horas semanais, nas atividades da disciplina BF590 – A - Fisiologia Humana do Desenvolvimento sob supervisão da Professora Doutora Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, do Instituto de Biologia desta Universidade.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 06 de agosto de 2009.

  
Antonio Maggiani  
Diretor Acadêmico

  
Marcelo Knoebel  
Pró-Reitor de Graduação

  
Euclides de Mesquita Neto  
Pró-Reitor de Pós-Graduação



UNICAMP

# Universidade Estadual de Campinas

A Universidade Estadual de Campinas, de acordo com a Resolução GR N° 34, de 21-08-2007, certifica que,

**Luiz Alberto Ferreira Ramos**

Brasileiro, natural do Estado de São Paulo, nascido a 05 de maio de 1960, RG: 14468754-9-SP

do curso de **Mestrado em Biologia Funcional e Molecular**

participou do Programa de Estágio Docente – PED, no Grupo C - Atividades de Apoio à Docência Parcial sob supervisão, no segundo período letivo de 2008, com dedicação de 08 (oito) horas semanais, nas atividades da disciplina BF284 – A - Fisiologia e Biofísica Humana Básica sob supervisão do Professor Doutor Miguel Arcanjo Areas, do Instituto de Biologia, desta Universidade.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, 09 de janeiro de 2009.

*Antonio Magalhães*  
Antonio Magalhães  
Diretor Acadêmico

*Edgar S. de Decca*  
Edgar S. de Decca  
Pró-Reitor de Graduação

*Teresa Dib Zambon Atvars*  
Teresa Dib Zambon Atvars  
Pró-Reitor de Pós-Graduação



# FeSBE 2008

20 a 23 de agosto de 2008  
Águas de Lindóia – São Paulo

## CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 11.022

**MELATONINA PROMOVE RELAXAMENTO VASCULAR EM RATOS  
COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.**

Ramos, L. A. F.<sup>1</sup>, Henrique, F. P.<sup>1</sup>, Ramos, L.A.F.<sup>1</sup>, Barros, B. F. de,  
Kassisse, D. M. G., Reyes, F. G. R., Areas, M. A.

<sup>1</sup> Depto de Fisiologia e Biofísica/ IB, UNICAMP Rua Roxo Moreira s/n  
- Barão Geraldo <sup>2</sup> Depto de Fisiologia e Biofísica/ IB, UNICAMP Rua  
Roxo Moreira s/n - Barão Geraldo, foi apresentado sob a forma de  
painel

na XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia  
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,  
de 20 a 23 de agosto de 2008.

Comissão Organizadora



# FeSBE 2008

20 a 23 de agosto de 2008  
Águas de Lindóia - São Paulo

## CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 11.006

SAL DE ANGELIS (HNO) PROMOVE RELAXAMENTO VASCULAR  
EM RATOS COM HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.

Henrique, F. P., Ramos, L. A. F.<sup>1</sup>, Barros, B. F. de, Kassisse, D. M.  
G., Reyes, F. G. R., Areas, M. A.

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP <sup>2</sup> Depto de  
Fisiologia e Biofísica/ IB, UNICAMP Rua Roxo Moreira s/n - Barão  
Geraldo, foi apresentado sob a forma de painel

na XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia  
Experimental - FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia - SP,  
de 20 a 23 de agosto de 2008.

Comissão Organizadora





# FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009  
Águas de Lindóia - São Paulo

## CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 11.048

EFEITOS DA MENOPAUSA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE ANÉIS DE AORTA DE FÊMEAS SHR.

Barros, B. F. , Ramos, L. A. F. , Henrique-cabrini, F. P. , Kassisse, D. M. G. , Reyes, F. G. R. , Areas, M. A.

DEPTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA/IB, UNICAMP foi apresentado sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia - SP, de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora