

CRISTIANE FONSECA FREITAS

**HIPERTENSÃO PULMONAR EXPERIMENTAL EM CÃES
ANESTESIADOS: PAPEL DA ENDOTELINA-1 E DO
TROMBOXANO A₂, E REVERSÃO PELO ÓXIDO NÍTRICO
INALATÓRIO**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Cristiane Fonseca Freitas.

Campinas, 01 de março de 2002.

*Prof. Dr. Edson Antunes
- Orientador -*

CAMPINAS

2002

CRISTIANE FONSECA FREITAS

**HIPERTENSÃO PULMONAR EXPERIMENTAL EM CÃES
ANESTESIADOS: PAPEL DA ENDOTELINA-1 E DO
TROMBOXANO A₂, E REVERSÃO PELO ÓXIDO NÍTRICO
INALATÓRIO**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

IDADE 30
CHAMADA T/UNICAMP
F884h
EX
OMBO BCI 49352
ROC 16-837102
DY
PREÇO R\$ 11,00
DATA 04/06/02
Nº CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

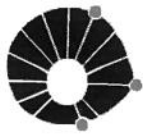
CM00168293-6

BIB ID 242724

F884h Freitas, Cristiane Fonseca
Hipertensão pulmonar experimental em cães anestesiados: papel da endotelina-1 e do tromboxano A₂, e reversão pelo óxido nítrico inalatório / Cristiane Fonseca Freitas. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Edson Antunes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

I. Pulmões – Doenças Obstrutivas. 2. Débito cardíaco. 3. Sistema cardiovascular. 4. Pressão arterial. I. Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Boin

Profa. Dra. Angelina Zanesco

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 01/03/02

Amor é o dom supremo

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o Dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, nada sou. Ainda que distribuisse todos os meus bens em sustento dos pobres, e ainda que entregasse a meu corpo para ser queimado; se não tiver amor, de nada valeria.

O amor é paciente, o amor é bondoso. Não tem inveja. O amor não é orgulhoso. Não é arrogante. Nem escandaloso. Ao buscar os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor. Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta

O amor jamais acabará. As profecias desaparecerão, o Dom das línguas cessará, o Dom da ciência findará. A nossa ciência é parcial, a nossa profecia é imperfeita. Quando chegar o que é perfeito, o imperfeito desaparecerá. Quando eu era criança. Falava como criança, pensava como criança, raciocinava como criança. Desde que me tornei homem, eliminei as coisas de criança. Hoje vemos como por um espelho, confusamente; mas então veremos face a face. Hoje conheço em parte; mas então conhecerei totalmente, como eu sou conhecido.

I Coríntios 13, 1-12

*A Deus, pela sua infinita misericórdia me
fez chegar ao fim de mais uma jornada em
busca do conhecimento.*

*Aos meus pais Antonio José de Freitas e Suzana Melo
Fonseca Freitas pelo amor, carinho e compreensão em todos os
momentos*

*A minha irmã Fabiana, pela ajuda e carinho durante
a realização deste trabalho*

*Aos irmãos, cunhado (as) e sobrinhos:, Marco Antonio
e Marlene, Ricardo e Neise, Dudu, Júlia, Simone, Silvana, Lili
e Andreia, Cacá, pelo apoio e incentivos*

A meu irmão Paulo Henrique.....saudades.....

A vocês Dedico este trabalho

*A Marcello Elston, João Gabriel e Guilia pelo apoio,
carinho, amizade e dedicação. durante a confecção desta tese.*

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela oportunidade de crescimento científico, amizade, carinho, confiança em mim depositada, paciência e exemplo de grandeza na arte de fazer ciência.

Meu sincero agradecimento

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela ajuda financeira e técnica durante a realização deste trabalho.

A Profa. Dra Dessanka Dragosavac, o meu respeito e o meu mais sincero agradecimento por todos os favores prestados

Ao Professores e colaboradores do departamento de farmacologia-FEM (UNICAMP): Angelina Zanescos, Elen Landucci, Stephen Hyslop e Heitor Moreno Jr., pela amizade e disponibilidade em colaborar sempre.

Aos amigos: Carla, Enilton, Ivani, Laura, Paula Rubya, pela amizade, ajuda e o carinho constante durante estes anos

Ao técnico Aguinaldo F. Azevedo, pela ajuda e o convívio agradável na realização dos experimentos

Aos amigos do departamento: Aghata, Alessandra Gambero, Alessandra Linardi, Alice, Aline, Amanda, Andressa, Cléber, Cristina, Donato, Erickson, Fernanda, Fernanda e Marcelo, Heloisa, Juliana, Juliano, Lara, Leige, Lúcia, Luciana, Marla, Nicola, Pamela, Patrícia, Raquel, Renata Pereira, Renata Pennachin, Renato Faro, Sara, Simone, Pisi, Tatiane, Valéria, Vanessa, pelo agradável ambiente de trabalho proporcionado.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da FCM-UNICAMP e funcionários pelo carinho com que sempre me trataram

Aos amigos Eliane, Miller, Davi e Daniela pela amizade, palavras animadoras e os bons momentos que desfrutamos nestes anos de convivência

A Ana Keldt pela presença e amizade constante ao longo da realização deste trabalho

Aos amigos Lilian, Flávio, Mariana, Daniel, Sérgio, Suzy, Linneo, Stella, Robison, Marina, Eric, pela amizade e confiança em mim depositada.

Aos amigos de Poços: Clódoaldo, Tereza Raquel, Raquel e Flávio, Geni e Tomaz, Eduardo, Rafael Dalle, Moacir, Silmara, Andrea, Fábio, Marcelo Ismar, Jorge, Luciano, Neusa e Benedito, Poliana, Maira, Vanius, Leandro, Antonelli, Cesar, Darnei, Ingrid, Pedro, Rachel, Raquel, Elias Zenun, Pe Saggio, Marcos Santos, pela atenção, palavra de apoio e conforto, carinho e constante presença em todos os momentos.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram na elaboração deste trabalho e cujos nomes não foram aqui citados.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xxvii
Lista de Figuras	xxxí
Lista de Tabelas	xxxv
Reagentes e Procedência	xxxvii
Resumo	xxxix
1. INTRODUÇÃO	43
1.1 Hipertensão Pulmonar (HP)	44
1.2 Síndrome do Desconforto Respiratório em Adultos (SDRA)	45
1.3 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	46
1.4 Choque Séptico	47
1.5 Síndrome Hepatopulmonar	48
1.6 Endotelina-1 e Hipertensão Pulmonar	49
1.7 Óxido Nítrico (NO) Inalatório na Hipertensão Pulmonar	54
1.8 A Hipertensão Pulmonar induzida pelo Complexo Heparina-Protamina	56
OBJETIVOS.....	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS	61

2.1	Animais.....	62
2.2	Procedimento Experimental	62
2.3	Obtenção dos Parâmetros Hemodinâmicos	66
2.4	Padronização da Hipertensão Pulmonar Induzida pelo Complexo Heparina-Protamina.....	67
2.5	Avaliação dos Efeitos Hemodinâmicos na Indução da Hipertensão Pulmonar induzida pelo Complexo Heparina-Protamina	67
2.6	Tratamento com Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan	68
2.7	Método do Óxido Nítrico (NO) Inalatório	69
2.8	Gasometria Arterial	70
2.9	Dosagem dos Níveis Plasmáticos de Tromboxano A ₂	70
2.10	Análise Estatística	71
3.	RESULTADOS	72
3.1	Padronização da Hipertensão Pulmonar induzida pelo Complexo Heparina-Protamina	73
3.2	Alterações Hemodinâmicas induzidas pelo Complexo Heparina-Protamina	77
3.3	Efeitos dos Tratamentos com Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan	80

3.4	Efeitos do tratamento com o Óxido Nítrico (NO) Inalatório	89
3.5	Níveis Plasmáticos de Tromboxano B ₂ (TxB ₂)	96
3.6	Gasometria Arterial	97
4	DISCUSSÃO	99
5	CONCLUSÃO	95
6	ABSTRACT	97
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE ABREVIACÕES

ASC.....	área de superfície corporal
Bpm.....	batimentos por minutos
Ca ²⁺	cálcio
DPOC.....	doença pulmonar obstrutiva crônica
DC.....	débito cardíaco
ECE.....	enzima conversora de endotelina
ET-1.....	endotelina-1
ET _A	receptor de endotelina tipo A
ET _B	receptor de endotelina tipo B
FC.....	frequência cardíaca
FiO ₂	fração inspiratória de oxigênio
IC.....	índice cardíaco
IRVP.....	índice de resistência vascular pulmonar
IRVS.....	índice de resistência vascular sistêmica
IS.....	índice sistólico
NO.....	óxido nítrico
NOS.....	óxido nítrico sintase
PAD.....	pressão de átrio direito
PAM.....	pressão arterial sistêmica média
PMAP.....	pressão média da artéria pulmonar

Lista de abreviações

pCO ₂	pressão parcial de dióxido de carbono
PCP	pressão capilar pulmonar
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGI ₂	prostaciclina
pO ₂	pressão parcial de oxigênio
ppET-1	pre-proendotelina
RVP	resistência vascular pulmonar
RVS	resistência vascular sistêmica
SDRA	síndrome do desconforto respiratório em adultos
TxA ₂	Tromboxano A ₂
VS	volume sistólico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do catéter de Swan-Ganz.....	64
Figura 2: Determinação do débito cardíaco pela técnica de termodiluição.....	65
Figura 3: Valores individuais da Pressão Média da Artéria Pulmonar em cães anestesiados submetidos a injeção de heparina (250UI/Kg) e protamina (250mg/Kg).....	74
Figura 4: Valores individuais da Pressão Média da Artéria Pulmonar em cães anestesiados submetidos a injeção de heparina (500UI/Kg) e protamina (5,0mg/Kg).....	75
Figura 5: Valores individuais da Pressão Média da Artéria Pulmonar em cães anestesiados submetidos a injeção de heparina (500UI/Kg) e protamina (10,0mg/Kg).....	76
Figura 6: Alterações hemodinâmicas Induzidas pelo complexo heparina-protamina. A) PMAP; B)Gradiente transpulmonar; C) PAM; D) FC;.....	78
Figura 7: Alterações hemodinâmicas Induzidas pelo complexo heparina-protamina. E) IC;; F) VS; G) IRVS;.....	79
Figura 8: Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado, Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan.....	82
Figura 9: Gradiente Transpulmonar (% de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado, Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan.....	83
Figura 10: Pressão Arterial Sistêmica Média (PAM – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado, Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan.....	84
Figura 11: Frequência Cardíaca (FC – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado, Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan.....	85

Figura 12: Índice Cardíaco (IC – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado, Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan.....	86
Figura 13: Índice Resistência Vascular Sistêmica (IRVS – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado, Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan.....	87
Figura 14: Alterações hemodinâmicas (% de variação) induzidas pela administração de endotelina e tezosentan em cães anestesiados. A) PAM; B) PMAP.....	88
Figura 15: Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado e NO	90
Figura 16: Gradiente Transpulmonar (% de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado e NO	91
Figura 17: Pressão Arterial Sistêmica Média (PAM – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado e NO.....	92
Figura 18: Frequência Cardíaca (FC – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado e NO.....	93
Figura 19: Índice Cardíaco (IC – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado e NO.....	94
Figura 20: Índice Resistência Vascular Sistêmica (IRVS – % de variação dos valores basais) dos grupos Não-tratado e NO.....	95
Figura 21: Níveis plasmáticos de Tromboxano B ₂	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gasometria Arterial de Cães Anestesiados e Ventilados com ar Ambiente (FiO_2 =21%).....	98
---	----

REAGENTES E PROCEDÊNCIA

Heparina Sódica.....	Organon Teknika (Santo André, SP, Brasil)
Sulfato de Protamina.....	Sigma Chem. CO. (St. Louis, EUA)
Diazepam.....	União Química (Embú-Guaçu, SP, Brasil)
Pentobarbital Sódico (Hypnol®).....	Cristália Pr. Quím. E Farm. (Itapira, SP, Brasil)
Citrato de Fentanila.....	Cristália Pr. Quím. E Farm. (Itapira, SP, Brasil)
Indometacina	Sigma Chem. CO. (St. Louis, EUA)
Dazoxibeno.....	Pfizer laboratórios (Sandwich, Inglaterra)
Tezosentan.....	Actelion (Allschwil, Suíça)
Óxido Nítrico inalatório.....	Air Liquide (São Paulo, SP, Brasil)

RESUMO

Neste estudo, investigamos os mecanismos farmacológicos responsáveis pela hipertensão pulmonar desencadeada pelo complexo heparina-protamina em cães anestesiados. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol, 30mg/kg, iv) combinados com citrato de fentanil (0,01 mg/Kg/h, iv) e diazepam (0,25 mg/Kg/h iv). A administração de 500 UI/Kg de heparina, seguida da administração de protamina (10 mg/Kg), causou um aumento de aproximadamente 280% da pressão arterial pulmonar, acompanhado de um aumento significativo do gradiente transpulmonar. Este aumento foi significativo 1 min após a protamina, mantendo-se significativamente elevado até aproximadamente 3 minutos após administração da protamina. Ao mesmo tempo em que se detectou a hipertensão pulmonar, observamos uma queda significativa da pressão arterial média, observada até aproximadamente 5 minutos após administração da protamina. Observamos ainda um aumento significativo da frequência cardíaca com queda acentuada do volume sistólico e do débito cardíaco. O índice de resistência vascular sistêmica não apresentou alterações significativas.

O pré-tratamento dos cães com indometacina (10 mg/Kg iv) reduziu marcadamente a hipertensão pulmonar e o gradiente transpulmonar determinado pela interação *in vivo* da heparina-protamina. A taquicardia e a queda do débito cardíaco foram também significativamente atenuados por este tratamento. O tratamento dos cães com dazoxibeno (10 mg/Kg iv) preveniu significativamente a hipertensão pulmonar e o gradiente transpulmonar, mas não alterou o aumento da frequência cardíaca, nem a queda de débito

cardíaco. O tratamento com tezosentan (10 mg/kg iv bolus e 10 mg/Kg/h iv infusão) reduziu significativamente a hipertensão pulmonar, e atenuou o aumento da frequência cardíaca e da queda de débito cardíaco

O tratamento com o óxido nítrico inalatório (3 ppm) reduziu a hipertensão pulmonar e o gradiente transpulmonar.

Os níveis de tromboxano A₂ mostraram-se elevados 2 min após a administração da protamina, mantendo-se elevados até o final do experimento. A indometacina preveniu a liberação de tromboxano A₂.

As análises da gasometria arterial mostraram que os valores de pO₂ e pCO₂ não foram significativamente alterados quer em cães controles, quer em cães tratados com dazoxibeno e tezosentan. Em resumo, nossos dados mostraram que a formação do complexo heparina-protamina *in vivo* induzem hipertensão pulmonar dependente da liberação de tromboxano A₂ e endotelina-1.

INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Pulmonar

A resistência vascular pulmonar (RVP) é aproximadamente 50 vezes menor que a do sistema circulatório, devendo-se esta diferença ao fato de a rede arteriolar pulmonar apresentar um baixo tônus muscular basal. Ao contrário, o sistema circulatório apresenta os vasos parcialmente contraídos, contribuindo com mesmos 75% da resistência periférica total do organismo (MACLEAN, 1998).

Na vigência de hipertensão pulmonar, a resistência vascular pulmonar eleva-se marcadamente, e a pressão arterial pulmonar atinge valores acima de 20 mmHg (em estado de repouso) ou de 30 mmHg (durante exercícios), que pode levar à falência do coração direito e morte.

A hipertensão pulmonar pode ser classificada em 1) hipertensão pulmonar primária (etiologia desconhecida), 2) hipertensão pulmonar persistente do neonato, e 3) hipertensão pulmonar secundária a doenças cardiovasculares e pulmonares. Dentre as doenças capazes de levar a hipertensão pulmonar, podemos citar a síndrome da angústia respiratória do adulto (SDRA), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), choque séptico e estados hipoxêmicos em geral (ZAPOL & SNIDER, 1977; MACLEAN, 1998; HAY, 1998). A hipertensão pulmonar é ainda observada clinicamente e experimentalmente na reversão do efeito anticoagulante da heparina pela protamina (LOWENSTEIN, 1989).

A causa mais comum que desencadeia a hipertensão secundária é a hipóxia. A exposição aguda à hipóxia resulta inicialmente em vasoconstrição arterial pulmonar e, conseqüentemente, elevação da pressão pulmonar. Estes fenômenos podem ser

acompanhados por policitemia e remodelação das paredes das artérias pulmonares (FAGAN *et al.*, 1999).

1.2 Síndrome do Desconforto Respiratório em Adulto (SDRA)

A hipertensão pulmonar aguda está invariavelmente presente em pacientes com a SDRA. Neste caso, a hipertensão pulmonar independe de variações do débito cardíaco e persiste mesmo após a correção da hipoxemia sistêmica (ZAPOL & SNIDER, 1977). Em um quadro grave de SDRA, é comum a ocorrência de oclusão tromboembólica da vasculatura pulmonar, podendo ainda levar a formação de edema, disfunção ventricular direita e redução do débito cardíaco (SIBBALD *et al.*, 1983; GATTINONI *et al.*, 1988).

Embora ainda não completamente elucidada, as alterações vasculares pulmonares decorrentes da SDRA são produzidas por uma combinação complexa que envolve a lesão pulmonar primária (aspiração, traumas e infecções), a resposta inflamatória à lesão (hipóxia, acidose, liberação de citocinas e metabólitos do ácido araquidônico, formação de componentes do sistema do complemento e inibidores da fibrinólise) e complicações iatrogênicas do tratamento intensivo (toxicidade por oxigênio e barotrauma). Acredita-se também que a produção de óxido nítrico (NO) esteja prejudicada na vigência da SDRA o que favorece a instalação de vasoconstrição e agregação plaquetária no organismo, (CREMONA *et al.*, 1991; DINH XUAN *et al.*, 1991). A inalação de NO reduz a resistência vascular pulmonar, aumentando a relação ventilação/perfusão, tendo, portanto, um efeito

benéfico neste quadro. (PEPKE-ZABA *et al.*, 1991; FROSTELL *et al.*, 1993).

1.3 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A hipertensão pulmonar é uma complicação séria da DPOC. O quadro clínico é resultante da combinação de três processos patológicos, a saber: bronquite crônica, enfisema e asma. Os dois primeiros são mais importantes no desencadeamento dessa doença.

No quadro de DPOC, onde a brônquite crônica tem um papel fundamental, o organismo passa a apresentar ventilação diminuída e aumento do débito cardíaco. Ou seja, cria-se uma situação de circulação rápida em um pulmão com prejuízo de ventilação; isto pode acarretar hipoxemia e policitemia. Finalmente, instalam-se a hipercapnia e acidose respiratória, levando à vasoconstrição arterial pulmonar e *cor pulmonale*. Em decorrência da hipoxemia, policitemia e retenção de CO₂ pode surgir insuficiência ventricular direita. Nesse tipo de DPOC, a hipertensão pulmonar é do tipo “pré-capilar” sendo quase exclusivamente devida a aumento da resistência vascular pulmonar que se instala principalmente em resposta à hipóxia aguda (ou crônica). A remodelação vascular é um fator fundamental que contribui para o desenvolvimento e manutenção destas condições. A hipertensão pulmonar na DPOC é normalmente branda (20 a 35 mm Hg), mas a pressão arterial pulmonar pode aumentar rapidamente durante exercícios, sono e episódios de insuficiência respiratória aguda. O aumento de pós-carga pode ainda favorecer o

desenvolvimento de insuficiência do ventrículo direito (NAVIN & GROSS, 1996; WANSTALL & JEFFERY, 1998).

Em um outro tipo de DPOC onde o enfisema tem papel fundamental, ocorrem danos graduais dos septos alveolares e destruição do leito capilar pulmonar, e, conseqüentemente, redução da capacidade do pulmão em oxigenar o sangue. O oxigênio passa a compensar esta deficiência reduzindo o débito cardíaco e produzindo hiperventilação. Isto resulta em um fluxo sanguíneo relativamente limitado em um pulmão ainda oxigenado com gasometria e pressão pulmonar normais (NAVIN & GROSS, 1996; WANSTALL & JEFFERY, 1998).

1.4 Choque Séptico

Sepses causadas por bactérias Gram negativas tais como dos gêneros *Serratias*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Escherichia coli* são a causa mais comum do choque séptico (ou choque endotóxico).

O choque séptico é caracterizado por dilatação arteriolar, hipotensão sistêmica, elevação do débito cardíaco e perfusão tecidual inadequada (PARILLO *et al.*, 1990). Além disso, a hipertensão pulmonar tem sido freqüentemente observada na sepsis humana e experimental (ADAMS & LEDINGHAM, 1977; AL-KAISI *et al.*, 1977; CASEY *et al.*, 1982; Li *et al.*, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1997; WANECEK *et al.*, 1997). Entretanto, os mecanismos responsáveis por sua instalação ainda não são claros. Em cães anestesiados, a

hipertensão pulmonar induzida por endotoxina é associada com reduções significativas do volume sistólico e da fração de ejeção do ventrículo direito, decorrentes sobretudo de alterações na impedância pulmonar (D'ORIO *et al.*, 1998). Em porcos, a hipertensão pulmonar em resposta à endotoxina parece ser resultante de constrição das artérias pulmonares proximais (fase inicial) e declínio na complacência vascular pulmonar distal (fase tardia) (LAMBERMONT *et al.*, 1999).

A hipotensão sistêmica observada tanto em pacientes, como em animais de experimentação, tem sido creditada em parte à superprodução de NO, oriunda da indução da NO sintase pelas endotoxinas bacterianas. De fato, a administração de inibidores da síntese de NO (L-NMMA e L-NAME) corrige a pressão arterial baixa nos pacientes críticos (PETROS *et al.*, 1994), mas, por outro lado, pode desencadear *per se* hipertensão pulmonar intensa e prolongada (AVONTUUR *et al.*, 1998). Assim, embora a inibição seletiva da NOS induzível (sem afetar a NOS constitutiva) em pacientes com choque séptico seja desejável, o aparecimento colateral da hipertensão pulmonar nestes pacientes pode representar uma complicação séria.

1.5 Síndrome Hepatopulmonar

Com o sucesso nos transplantes de fígado ortotópico, tem havido grande interesse na compreensão da síndrome hepatopulmonar e hipertensão pulmonar, (SCOTT *et al.*, 1999; KROWKA, 1997; KROWKA, 2000b).

A síndrome hepatopulmonar é caracterizada por hipoxemia arterial causada pela dilatação vascular intrapulmonar que desenvolve como consequência da disfunção hepática. Esta disfunção vascular pulmonar é apresentada pelo menos em duas formas patológicas: disfunção precapilar/dilatação capilar e *shunt* anatômico intrapulmonar. Esta síndrome não é, geralmente acompanhada de hipertensão portal ou cirrose e por isso é raramente reconhecida em centros de transplante de fígado em adultos e crianças (MARTINEZ *et al.*, 1999; EGAWA *et al.*, 1999; KROWKA, 2000a). As terapias médicas têm sido desapontadoras, (SCOTT *et al.*, 1999; HERVE *et al.*, 1998). Mas melhoras significativas têm sido obtidas com a utilização do azul de metileno, aspirina e prednisona (HERVE *et al.*, 1998).

1.6 Endotelina-1 e Hipertensão Pulmonar

A endotelina (ET-1) é um potente peptídeo vasoconstritor primeiramente descrito em sobrenadante de cultura de células endoteliais de aorta de porco (YANAGISAWA *et al.*, 1988). Desde sua descoberta até os dias de hoje houve grandes avanços na compreensão do mecanismo de síntese e dos tipos de receptores de endotelina, bem como dos fenômenos fisiopatológicos nos quais este peptídeo está envolvido (HAY, 1998). Poucos anos após a descoberta de ET-1, foi descrito que os níveis plasmáticos de ET-1 em pacientes com hipertensão pulmonar primária e secundária estão elevados (STEWART *et al.*, 1991; CODY *et al.*, 1992), sendo os mesmos, muitas vezes, correlacionados com a severidade e

prognóstico da doença.

Análises de genomas humanos de endotelina demonstraram a existência de três genes distintos de endotelina: ET-1, ET-2 e ET-3. A ET, inicialmente isolada de cultura de células endoteliais suínas, foi denominada de ET-1 ao passo que as outras duas foram designadas de ET-2 e ET-3 (INOUE *et al.*, 1989). A ET-1 é formada a partir de um precursor que contém 203 resíduos de aminoácidos denominado de preproendotelina (ppET-1). Esta é clivada por uma endopeptidase originando a pró-endotelina (ou *big endotelina*), um produto intermediário contendo 39 resíduos de aminoácidos em porcos e 38 resíduos em humanos (YANAGISAWA *et al.*, 1988). A ET-1, com 21 resíduos de aminoácidos, origina-se de uma clivagem proteolítica da pró-endotelina pela enzima conversora de endotelina (ECE).

A pró-ET-1 e a ET-1 são equipotentes no que diz respeito ao aumento da pressão arterial *in vivo*; entretanto, a pró-ET-1 possui apenas 1 % da potência pressórica da ET-1 em relação ao efeito contrátil em segmentos vasculares *in vitro* (KIMURA *et al.*, 1989), mostrando assim que a pró-ET-1 é rapidamente convertida em ET-1 *in vivo* sob ação da enzima conversora de endotelina (D'ORLEANS-JUSTE *et al.*, 1990). As enzimas conversoras de endotelina foram clonadas, sendo a primeira delas, a ECE-1 (XU *et al.*, 1994; SHIMADA *et al.*, 1994), tida como a responsável pela conversão de pró-ET-1 em ET-1 ao nível de membrana celular. A segunda, ECE-2 (EMOTO *et al.*, 1995), seria responsável pela conversão ao nível intracelular.

Em relação aos receptores das ETs, dois tipos foram descritos: ET_A (ARAI *et al.*, 1990) e ET_B (TAKAI *et al.*, 1992). Estes receptores estão distribuídos nos vários tecidos do

organismos em diferentes densidades e estão envolvidos no controle da vasomotricidade, liberação de prostanóides, óxido nítrico pelas células endoteliais e motilidade do trato gastrointestinal (SCHIFFRIN, 1998; KUWAHARA *et al.*, 2000; GIARDINA *et al.*, 2001). O receptor ET_B foi posteriormente subdividido em ET_{B1} (vasodilatação em mesentério de ratos) e o ET_{B2} (contração de estômago de ratos e vasoconstrição em artéria pulmonar de ratos) (WARNER *et al.*, 1993_{a,b}; OLHSTEIN *et al.*, 1994_a).

O efeito vasoconstritor da endotelina é mediado por dois sistemas distintos de transdução: ativação de canais de Ca^{2+} (YANAGISAWA *et al.*, 1988; GOTO *et al.*, 1989; KASUYA *et al.*, 1989_a) e/ou ativação de fosfolipase C (ABDAEL-LAFIT & ZHANG, 1991; HU *et al.*, 1991), os quais estão intimamente ligados à proteína G. O efeito vasodilatador parece ser devido à liberação de prostanóides, principalmente PGI_2 e PGE_2 , por ação da fosfolipase A_2 (DE NUCCI *et al.*, 1988_b; FILEP *et al.*, 1992; GRANSTAM *et al.*, 1991; RESINK *et al.*, 1988; WARNER *et al.*, 1989_b), e liberação do NO pelas células endoteliais (DE NUCCI *et al.*, 1988_b; WARNER *et al.*, 1989_b) e efeito este mediado pela ativação de receptores do subtipo ET_B (CLOZEL *et al.*, 1992). Em ratos, a infusão de ET-1 causa aumento do fluxo sanguíneo, pulmonar e hepático, devendo-se isto à redistribuição do débito cardíaco para estes leitos vasculares. A atividade vasoconstritora da ET-1 é mediada pela ativação tanto dos receptor ET_A como do ET_B (SUMNER *et al.*, 1992; OKAMURA *et al.*, 1992; MORELAND *et al.*, 1992; GODFRAIND, 1993; WARNER *et al.*, 1993; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1995). Assim, acredita-se que os efeitos vasoconstritores da ET-1 sejam modulados pela liberação concomitante de NO, PGI_2 e PGE_2 (DE NUCCI *et al.*, 1988; RAE *et al.*, 1989) que reduziriam a amplitude e a duração

das respostas vasoconstritoras, tanto *in vivo* como *in vitro* (WARNER *et al.*, 1989_a; RAE *et al.*, 1989; WITHRINGTON *et al.*, 1989; GRASSI-KASSISSE *et al.*, 1995; FARO *et al.*, 1995).

Em pulmões, a ET-1 é expressa abundantemente, sugerindo que a mesma possa ter um importante papel na regulação do tônus vascular pulmonar (HEMSÉM, 1991; MARCINIAK *et al.*, 1992). Em vasos pulmonares *in vitro*, a ET-1 causa potente contração via receptores ET_A e ET_B, e mitogênese em artérias pulmonares humana por um mecanismo mediado por receptores ET_A (HAY, 1998). Efeitos estes presentes na hipertensão pulmonar sugerindo um papel importante da ET-1 nessa patologia. Níveis plasmáticos elevados de ET-1 em pacientes adultos e crianças com hipertensão pulmonar têm sido relatados em vários estudos, existindo, em alguns casos, correlação dos níveis desse peptídeo com a severidade das doenças (GOLDIE *et al.*, 1996; MICHAEL & MARKEWITZ, 1996; HAY, 1998; FRANCO-CERECEDA *et al.*, 1999). Entretanto, na hipertensão pulmonar secundária à doença cardíaca congênita, TUTAR *et al.* (1999) mostraram não haver correlação direta entre os níveis plasmáticos de ET-1 e hipertensão pulmonar. Por outro lado, em biópsias de pacientes com hipertensão pulmonar devido à doença cardíaca congênita, demonstrou-se uma maior densidade de receptores ET_A nas artérias e parênquima pulmonar (LUTZ *et al.*, 1999).

Em estudos experimentais, WANECEK *et al.* (1997) demonstraram que a hipertensão pulmonar induzida por endotoxina em porcos foi eficientemente prevenida por uma combinação de bosentan (antagonista não seletivo de receptores de ET) e diclofenaco (inibidor da ciclooxigenase). Resultados semelhantes com o emprego de antagonistas

seletivos (BQ 123, BMS-182874, ZD 1611) e não seletivos e receptores de ET (SB 217242 e bosentan) foram recentemente descritos em diversos tipos de hipertensão pulmonar, tais como aquelas associadas à doença da membrana hialina em ovelhas (IVY *et al.*, 1998), pós-*bypass* cardiopulmonar em porcos (CARTEAUX *et al.*, 1999) e induzida por hipóxia em ratos e porcos (BIALECKI *et al.*, 1998; HOLM *et al.*, 1998; UNDERWOOD *et al.*, 1999). Neste último trabalho, os autores sugerem que a hipertensão pulmonar é mediada por receptores do subtipo ET_A ao passo que o bloqueio dos receptores do subtipo ET_B poderia alterar os níveis elevados de ET-1. Assim, parece que os receptores do subtipo ET_A, aumentados após exposição à hipóxia, exercem um papel importante na remodelação vascular pulmonar associada à hipertensão pulmonar (SOMA *et al.*, 1999). Por outro lado, os receptores ET_B, também aumentados no endotélio pulmonar após exposição à hipóxia, seriam responsáveis pela liberação de NO, garantindo um contínuo estado vasodilatador contrabalançando o desenvolvimento da hipertensão pulmonar pela hipóxia (MURAMATSU *et al.*, 1999, SOMA *et al.*, 1999). Curiosamente, alguns autores relatam que, ao lado de aumento da expressão do RNAm da pré-proET-1 na hipertensão pulmonar, ocorre paralelamente redução da expressão do RNAm do receptor ET_B (BLACK *et al.*, 1998; IVY *et al.*, 1998).

Embora todas essas evidências sugiram que a ET-1 esteja envolvida na fisiopatologia da hipertensão pulmonar, é ainda bastante discutido se a ET-1 é um mediador da hipertensão pulmonar ou simplesmente um marcador da mesma.

1.7 Óxido Nítrico (NO) Inalatório na Hipertensão Pulmonar

Em pulmões normais, o tônus vascular pulmonar basal é baixo e a administração de NO exógeno por inalação tem pouco efeito sobre a resistência vascular pulmonar. Na hipertensão pulmonar, alguns estudos clínicos têm procurado avaliar o efeito do NO inalatório na reversão do aumento da resistência vascular pulmonar. Em 18 pacientes com doenças pulmonar crônica ou cardíaca, PEPKE-ZABA *et al.* (1991) relataram que a inalação de 40 ppm de NO reduziu a resistência vascular pulmonar, sem afetar a resistência vascular sistêmica. Efeitos hemodinâmicos semelhantes foram relatados em pacientes com hipertensão pulmonar decorrente de troca da valva mitral (DOYLE, 1981), DPOC (ADATIA *et al.*, 1993; FRATACCI *et al.*, 1992) e crianças com hipertensão pulmonar idiopática não responsiva a vasodilatadores intravenosos (KINSELLA *et al.*, 1993). Assim, o NO inalado causa redução da pressão arterial pulmonar e aumento do fluxo sanguíneo pulmonar sem reduzir a resistência vascular sistêmica (ROBERTS *et al.*, 1993a).

Em relação ao emprego do NO inalatório na SDRA, acredita-se que o NO inalado difundi de regiões ventiladas dos pulmões para a vasculatura pulmonar, causando relaxamento do músculo liso vascular pulmonar, reduzindo consequentemente a hipertensão pulmonar (FROSTELI *et al.*, 1991; FRATACCI *et al.*, 1991). O NO inalado, provavelmente, distribui-se melhor nos alvéolos melhor ventilados. Assim, quando o tônus vasomotor está aumentado, a vasodilatação nas regiões bem ventiladas deve provocar um desvio (“roubo”) do fluxo sanguíneo da artéria pulmonar para os alvéolos bem ventilados, melhorando o acoplamento ventilação/perfusão e a oxigenação arterial na SDRA.

ROSSAINT *et al.* (1993), demonstrou que o NO reduz seletivamente a pressão arterial pulmonar causando melhora da oxigenação (BIGATELLO *et al.*, 1993; PAYEN *et al.*, 1993; GROVER *et al.*, 1993; WYSOCKI *et al.*, 1993).

Em um outro estudo, crianças com hipertensão pulmonar crônica devido a má-formação cardíaca foram submetidas a inalação de 20 a 80 ppm de NO por 10 minutos (ROBERTS *et al.*, 1993b). Observou-se redução imediata da pressão arterial pulmonar e da resistência vascular pulmonar, enquanto a pressão arterial sistêmica e a resistência vascular sistêmica permaneceram inalteradas. Em adultos submetidos a diversos tipos de cirurgia cardíaca os quais necessitaram de circulação extracorpórea e ventilação mecânica, a inalação de NO (20 ppm) reduziu a pressão da artéria pulmonar (antes e depois da circulação extracorpórea) e a resistência vascular pulmonar, não afetando a hemodinâmica sistêmica (RICH *et al.*, 1993).

ZAYER *et al.* (1993) estudaram os efeitos do NO inalado (6 a 100 ppm) em modelos de hipertensão pulmonar persistente em neonatos de carneiros. Os autores relataram redução dose-dependente da pressão arterial e resistência vascular pulmonar. A redução do *shunt* resultou em elevação da pO_2 e diminuição da pCO_2 . A pressão sistêmica não foi afetada pela inalação de NO (KINSELLA *et al.*, 1992a,b; ROBERTS *et al.*, 1992; KINSELLA E ABMAN 1993; ZAYER *et al.*, 1993). Na hipertensão pulmonar induzida por *Streptococcus* do grupo B em porcos demonstrou-se que a inalação de NO (150 ppm) reverte a hipertensão pulmonar, mas não modifica as anormalidades ventilação/perfusão e a hemodinâmica sistêmica (BERGER *et al.*, 1993).

1.8 A Hipertensão Pulmonar Induzida pelo Complexo Heparina-Protamina

O uso clínico da protamina foi primeiramente relatado por HAGERDORN *et al.* (1936) quando os autores sugeriram que a relativa insolubilidade do complexo protamina-insulina poderia retardar a velocidade de absorção da insulina, aumentando a atividade biológica desta substância após a injeção subcutânea. Posteriormente, cogitou-se a possibilidade de a protamina também prolongar o efeito anticoagulante da heparina. Contudo, isto não foi observado em virtude de a protamina inibir eficientemente a ação da heparina, tanto *in vitro* como *in vivo* (CHARGAFF & OLSON, 1937). Depois disso, a neutralização da atividade anticoagulante da heparina pela protamina tornou-se uma prática comum após cirurgias em que se emprega circulação extracorpórea (HORROW, 1985).

Em ovelhas e porcos, a protamina reverte o efeito anticoagulante da heparina, podendo levar à contração das vias aéreas e liberação de tromboxano A₂ (TxA₂); (MOREL *et al.*, 1988; CONZEN *et al.*, 1989), um metabólito do ácido araquidônico com potente propriedade vasoconstritora e agregante plaquetária. Estas respostas são, provavelmente, decorrentes da interação de molécula aniônica (heparina) com molécula catiônica (protamina). Ou seja, o complexo heparina-protamina (H-P) ativaria o metabolismo do ácido araquidônico levando à formação de TxA₂, causando, por sua vez, vasoconstrição, broncoconstrição pulmonar e hipertensão pulmonar (LOWENSTEIN, 1989).

A hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina *in vivo* desenvolve-se facilmente em ovelhas e porcos, sendo menos evidente em humanos (LOWENSTEIN *et al.*, 1988). As razões para esta discrepância não são claras, mas a

hipótese mais provável é que o complexo heparina-protamina, ao interagir com macrófagos perivasculares pulmonares, determinaria a formação de grandes quantidades de Tromboxano A₂, supostamente o principal causador da hipertensão pulmonar. Os macrófagos pulmonares estariam presentes em grande número na microcirculação pulmonar de certas espécies incluindo ovelhas, vacas e porcos, e em menor número no homem (WARNER *et al.*, 1986; STAUB, 1988; SCHAPIRA & CHRISTMAN, 1990). De fato, existe grande similaridade da pressão pulmonar em ovelhas que receberam o complexo heparina-protamina com aquelas em que se administrou micropartículas circulatórias capazes de ativar macrófagos pulmonares (CHANG & VOELKEL, 1989). Aumento da concentração plasmática de TxA₂ foi também relatado em modelos de hipertensão pulmonar em porcos e ovelhas (DEGGES *et al.*, 1987; MOREL *et al.*, 1988). A hipótese do TxA₂ como principal mediador da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina em ovelhas foi ainda apoiada por MONTALESCOT *et al.* (1990). Demonstrou-se também que a hipertensão pulmonar mediada pela formação de TxA₂ em carneiros é prevenida pela inalação de NO (40-80 ppm), sem causar vasodilatação sistêmica (FRATACCI *et al.*, 1991).

Apesar dessas evidências, ainda não é conhecido se o complexo heparina-protamina *in vivo* é, de fato, o agente causador da hipertensão pulmonar durante a reversão do efeito anticoagulante da heparina pela protamina. A simples mistura da heparina-protamina na seringa e injeção desta mistura no animal parece já determinar o aparecimento da hipertensão pulmonar (STEFANISZYN *et al.*, 1984; HORIGUCHI *et al.*, 1995). Entretanto, o complexo heparina-protamina formado *in vitro* (na seringa) é bastante

diferente daquele formado *in vivo*, uma vez que, nesta última situação, a formação do complexo pode ser afetada pela antitrombina III e outras proteínas plasmáticas.

OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto é o de investigar os mecanismos pelos quais a formação *in vivo* do complexo heparina-protamina desencadeia hipertensão pulmonar em cães anestesiados. A hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina ainda é pouco estudada, particularmente em cães onde os estudos são escassos. Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- 1) Padronizar o modelo de hipertensão pulmonar induzido pelo complexo heparina-protamina em cães anestesiados;
- 2) Investigar a participação da endotelina-1 e tromboxano A₂ na hipertensão pulmonar induzidas pelo complexo heparina-protamina;
- 3) Investigar o efeito do protetor NO inalatório na vigência da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados cães SRD de ambos os sexos, adultos, pesando de 8 a 15 Kg, procedentes do canil do CEMIB-UNICAMP. Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética animal, do Instituto de Biologia da UNICAMP, (n.º 169-1)

2.2 Procedimento Experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol®, 30 mg/kg, i.v.), após o qual foram intubados com uma cânula endotraqueal (7.5 ou 8.0, Rüsch, Alemanha) e artificialmente ventilados através de um respirador volumétrico Newport (modelo E 100i). A anestesia foi mantida combinando-se citrato de fentanil (0.01 mg/kg/h) e diazepam (0.25 mg/kg/h).

A artéria femoral esquerda foi canulada a fim de se registrar a pressão arterial sistêmica, através de transdutor de pressão (MX-860, Medex, EUA). A veia femoral esquerda foi canulada para a administração e infusão de drogas. Através da veia femoral direita, introduziu-se catéter de Swan-Ganz 7F (Edwards, EUA; Figura 1) o qual foi locado na artéria pulmonar e conectado a dois outros transdutores de pressão (MX-860, Medex, EUA) onde permitiu-se o registro da pressão da artéria pulmonar e da pressão de átrio direito. O catéter de Swan-Ganz permitiu ainda a obtenção do débito cardíaco (DC) pela técnica de termodiluição. Inicialmente descrita por GANZ *et al* (1971), esta técnica consiste

na injeção rápida de 10 ml de soro fisiológico frio (entre 0 e 25°C) através do lúmen proximal do catéter de Swan-Ganz. O método mede a mudança de temperatura do injetado à medida em que a coluna de líquido se desloca pelo sangue (Figura 2), fornecendo em instantes o DC do animal em litros/min. O DC, foi realizado no mínimo em duplicata. A frequência cardíaca foi calculada através de eletrocardiograma de superfície (derivação I). Todos os catéteres foram preenchidos com salina heparinizada (10 UI/ml) a fim de se evitar a formação de coágulos. Os parâmetros hemodinâmicos foram visualizados continuamente em uma tela, utilizando-se monitor multiprogramável (SDM 2000, Dixtal, Brasil).

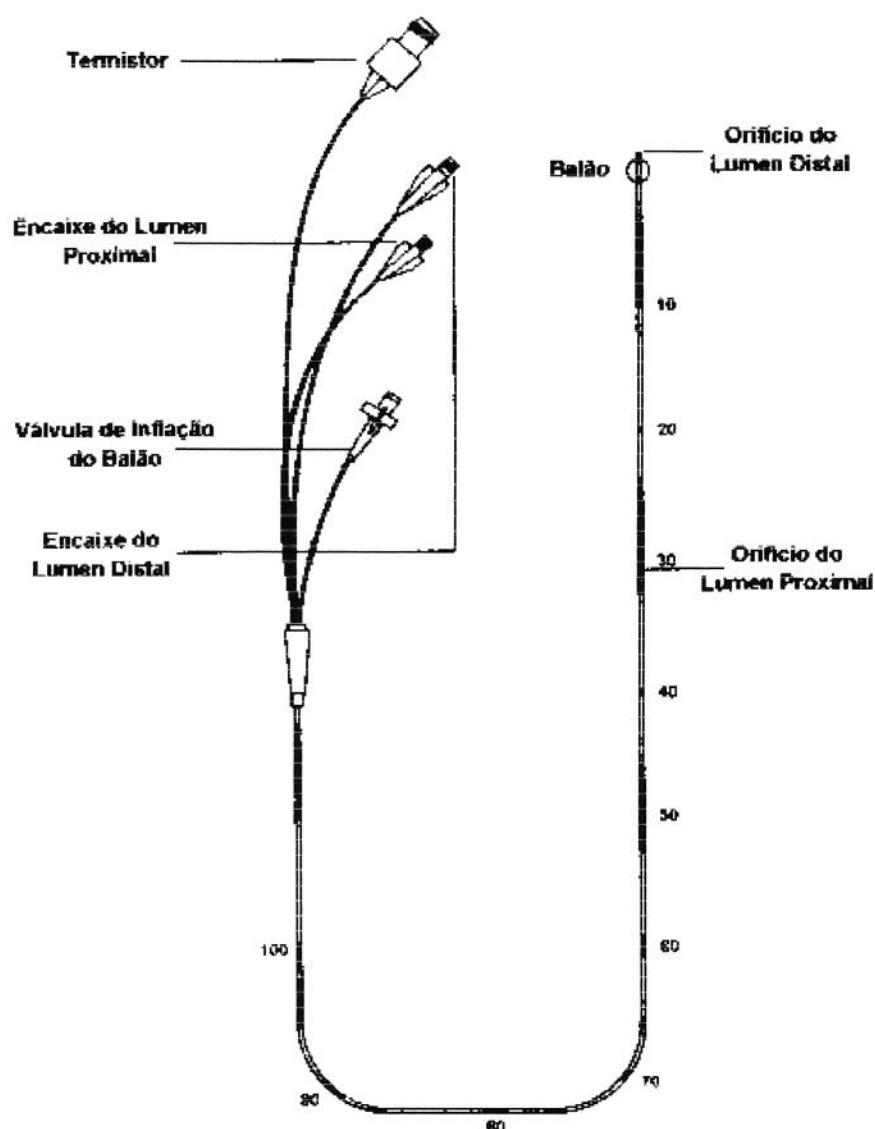


Figura 1 : Representação esquemática do cateter de Swan-Ganz. O termistor é conectado ao cabo do debitômetro. Os encaixes dos lúmens proximal e distal são conectados a transdutores de pressão para medida da pressão de átrio direito e da pressão arterial pulmonar, respectivamente

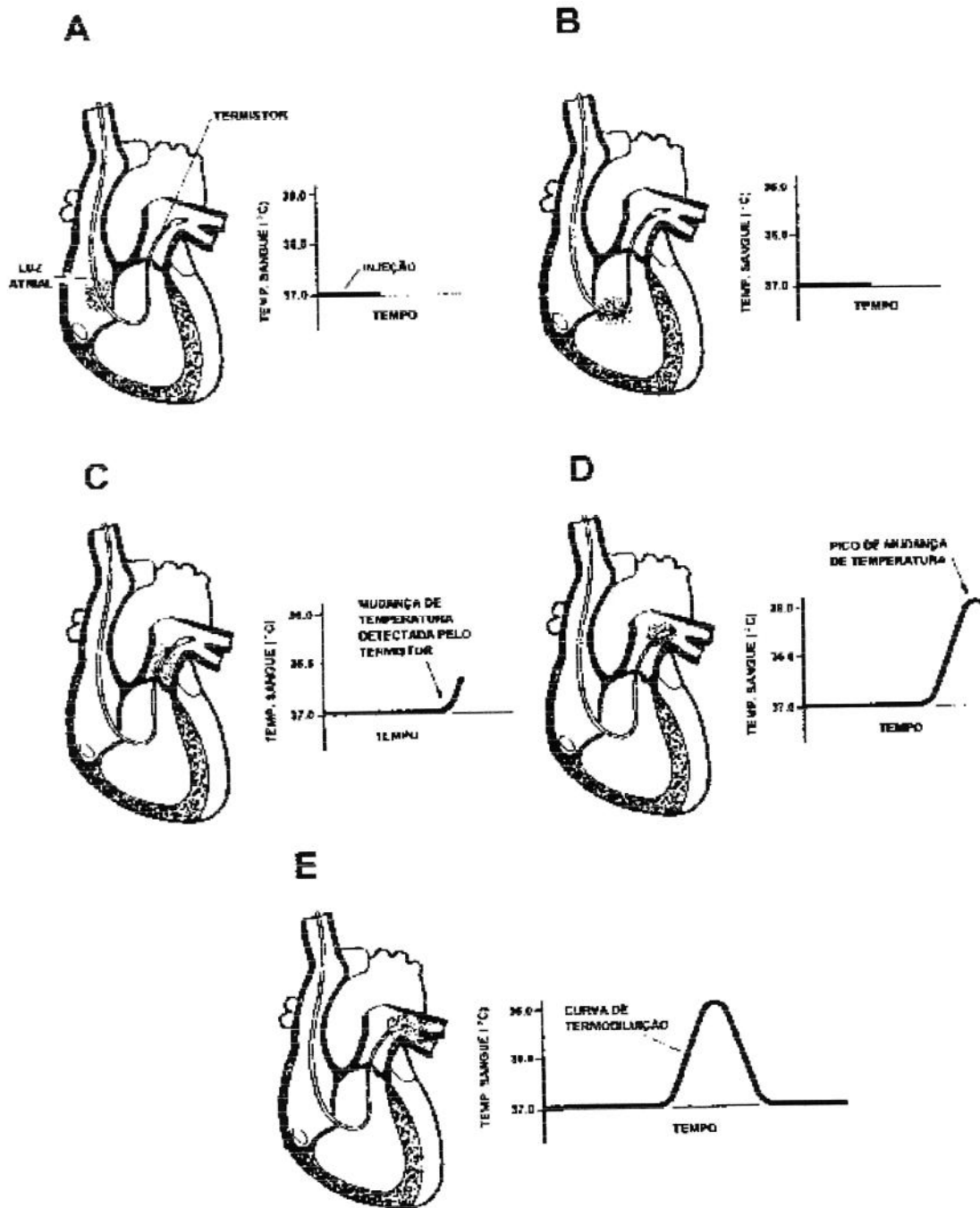


Figura 2 : Determinação do débito cardíaco pela técnica de termodiluição. As alterações na temperatura do injetado são captadas pelo termistor localizado a 4 cm da extremidade do catéter

2.3. Obtenção dos Parâmetros Hemodinâmicos

Os parâmetros hemodinâmicos medidos foram os seguintes: pressão arterial média (PAM), pressão média da artéria pulmonar (PMAP), pressão de átrio direito (PAD), frequência cardíaca (FC) e débito cardíaco (DC). A pressão capilar pulmonar (PCP) foi calculada a partir da pressão diastólica da artéria pulmonar.

A partir destes valores, os valores de outras variáveis hemodinâmicas foram obtidos indiretamente, tais como resistência vascular sistêmica (RVS), cuja fórmula é a seguinte:

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

Onde 80 é o fator que transforma a unidade de resistência de mmHg/l/min para dina.s/cm⁵.

Para a resistência vascular pulmonar, optamos por expressá-la como gradiente transpulmonar, o qual é calculado da seguinte forma:

$$\text{Gradiente transpulmonar} = (PMAP - PCP) \times 80 \times SC$$

Considerando-se a variação do peso dos animais, optamos por expressar os resultados de débito cardíaco, resistência vascular sistêmica sob a forma de índice, os quais estão corrigidos pela superfície corporal (SC, relação entre a distância naso-anal e o peso dos animais). Consequentemente, o débito cardíaco está expresso como índice cardíaco (IC), e a resistência vascular como índice de resistência vascular sistêmica (IRVS). As fórmulas utilizadas para os cálculos são as seguintes:

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

$$IRVS = RVS \times SC$$

2.4 – Padronização da Hipertensão Pulmonar Induzida pelo Complexo Heparina-Protamina

A hipertensão pulmonar é caracterizada por um aumento da pressão média arterial pulmonar, como consequência de aumento de resistência vascular pulmonar.

Na padronização da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina utilizamos 3 grupos experimentais, como descrito a seguir:

Grupo P1: Utilizamos uma concentração de 250 UI/Kg de heparina e 2.5 mg/Kg de protamina, com intervalo de 5 min entre as drogas. Neste grupo foram utilizados um n de 4 animais;

Grupo P2: Utilizamos uma concentração de 500 UI/Kg de heparina e 5.0 mg/Kg de protamina, com intervalo de 3 min entre as drogas. Neste grupo foram utilizados um n de 4 animais;

Grupo P3: Utilizamos uma concentração de 500 UI/Kg de heparina e 10.0 mg/Kg de protamina, com intervalo de 3 min entre as drogas. Neste grupo foram utilizados um n de 5 animais.

2.5 – Avaliação dos Efeitos Hemodinâmicos na Hipertensão Pulmonar pelo Complexo Heparina-Protamina

Na avaliação dos parâmetros hemodinâmicos utilizamos 18 animais divididos em 3

grupos.

Grupo Heparina/protamina: Após estabilização hemodinâmica do animal, avaliamos os parâmetros hemodinâmicos na indução anestésica (basal) aos 5, 10 e 15 min. Em seguida, administramos 500 UI/kg de heparina por via intravenosa sob a forma de *bolus*. Os parâmetros hemodinâmicos foram novamente avaliados aos 1, 2 e 3 min. Três minutos após a injeção da heparina, administramos intravenosamente 10 mg/kg de protamina em *bolus*. Os parâmetros hemodinâmicos foram reavaliados a cada 30 segundos durante os primeiros 5 minutos após o início da injeção, e aos 10 e 15 minutos. Neste grupo foram utilizados um *n* de 12 animais;

Grupo Heparina/salina: Administramos 500 UI/kg de heparina por via intravenosa sob a forma de *bolus*. Três minutos após a injeção da heparina, administramos intravenosamente 3 ml de salina em *bolus*. Os parâmetros hemodinâmicos foram avaliados nos mesmos tempos do grupo heparina/protamina. Neste grupo foram utilizados um *n* de 3 animais;

Grupo Salina/protamina: Administramos 3 ml de salina por via intravenosa sob a forma de *bolus*. Três minutos após a injeção da salina, administramos intravenosamente 10 mg/Kg de protamina em *bolus*. Os parâmetros hemodinâmicos foram avaliados nos mesmos tempos do grupo heparina/protamina. Neste grupo foram utilizados um *n* de 3 animais.

2.6 – Tratamento com Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan

Os tratamentos com inibidor da ciclooxigenase (indometacina) e da de tromboxano sintetase (dazoxibeno) foram realizados para investigar a participação do tromboxano A₂ na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina

O tratamento com tezosentan (antagonista de receptor ET_A e ET_B) foi realizado para investigar o papel da endotelina-1 na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina.

Estas drogas foram administradas antes da indução da hipertensão pulmonar pelo complexo heparina-protamina (antes da administração da heparina). Foram utilizados 18 animais divididos em 3 grupos distintos: Grupo Indometacina, grupo Dazoxibeno, grupo Tezosentan.

Grupo Indometacina: Administramos 10 mg/Kg de indometacina em *bolus* intravenosamente 30 min antes da administração da heparina. Neste grupo foram utilizados um *n* de 6 animais;

Grupo Dazoxibeno: Administramos 10 mg/Kg de dazoxibeno em *bolus* intravenosamente 10 min antes da administração da heparina. Neste grupo foram utilizados um *n* de 5 animais;

Grupo Tezosentan: Administramos 10 mg/Kg de Tezosentan em *bolus* seguido de uma infusão de 10mg/Kg/h intravenosamente 10 min antes da administração da heparina. Neste grupo foram utilizados um *n* de 7 animais.

2.7 – Método de Óxido Nítrico Inalatório

Após a estabilização do animal, previamente entubado e ventilado com ar ambiente ($\text{FiO}_2 = 21\%$), foi instaurado uma tensão de óxido nítrico de 3 ppm aos animais. Esta tensão foi monitorada usando-se o NOx BOX série 257 (Upchurch, Kent, Inglaterra). Um min após a inalação do óxido nítrico, foi induzido a hipertensão pulmonar pela heparina-protamina, conforme descrito anteriormente.

2.8 – Gasometria Arterial

Amostras de 3 ml de sangue arterial foram coletadas da artéria femoral em seringas heparinizadas nos seguintes tempos: (1) antes da administração da heparina, (2) dois minutos após a administração da heparina, (3) dois minutos após a injeção de protamina e (4) 15 min após a injeção de protamina. Após a coleta das amostras, acoplou-se um batoque próprio para vedar as seringas a fim de se evitar o contato das amostras com o ar. O material foi analisado em um período máximo de 30 minutos, usando-se o equipamento Bio Nova Stat Profile 5 (Abott, EUA). Nos grupos tratados com dazoxibeno e tezosentan, uma amostra de sangue arterial foi coletada aos 5 min após a administração da droga.

2.9 – Dosagem dos Níveis Plasmáticos de Tromboxano A_2

Amostras de sangue venoso foram coletadas nos períodos: (1) antes da administração da heparina, (2) dois minutos após a administração da heparina, (3) dois

minutos após a injeção de protamina e (4) 15 min após a injeção de protamina. No grupos tratados com indometacina, uma amostra de sangue venoso foi coletada aos 5 min após a administração da droga. As amostras foram purificadas e dosadas utilizando um Kit (Cayman, E.U.A.) para dosagem de tromboxano B₂ pelo método ELISA.

2.10 – Análise Estatística

Os dados estão expressos como médias $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.) para “N” experimentos. Para comparação entre os grupos experimentais, foi empregado análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett ou teste de Duncan (software US. 04^a Graphpad Instat, 1990). Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

3.1. Padronização da Hipertensão Pulmonar induzida pelo Complexo Heparina–Protamina

Nos primeiros protocolos, utilizamos uma concentração de 250 UI/Kg de heparina e 2.5 mg/kg de protamina, com um intervalo de 5 min entre a primeira e segunda droga. Neste esquema, não obtivemos alterações significativas da pressão arterial pulmonar (Fig. 3).

Em um segundo grupo experimental, utilizamos 500 UI/kg de heparina, administrada 3 min antes da injeção de 5.0 mg/Kg de protamina. Neste esquema notamos que apenas 1 animal, de um total de 4, apresentou hipertensão pulmonar (Fig. 4).

Finalmente, decidimos administrar 500 UI/Kg de heparina, dada 3 min antes da injeção de 10 mg/Kg de protamina. Neste esquema, 100% dos animais apresentaram hipertensão pulmonar significativa, embora com graus variáveis (Fig. 5). Dessa forma, para os protocolos posteriores estabelecemos as doses de 500 UI/Kg de heparina e 10 mg/Kg de protamina, com intervalo de 3 min entre ambas.

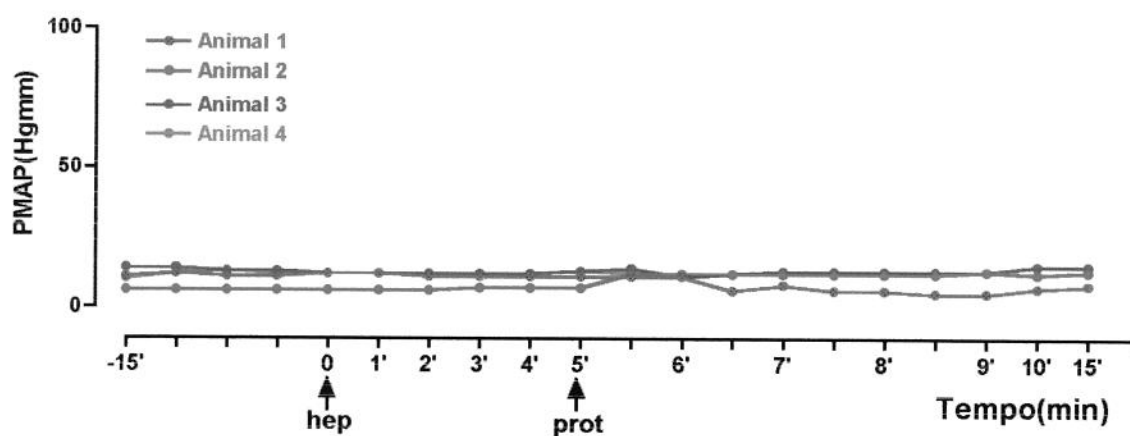


Figura 3 : Valores individuais da Pressão Média da Artéria Pulmonar em cães submetidos à injeção de 250 UI/Kg de heparina, 5 min antes da injeção de protamina (2,5 mg/Kg). **hep**, Heparina; **prot**, protamina; **PMAP**, pressão média da artéria pulmonar.

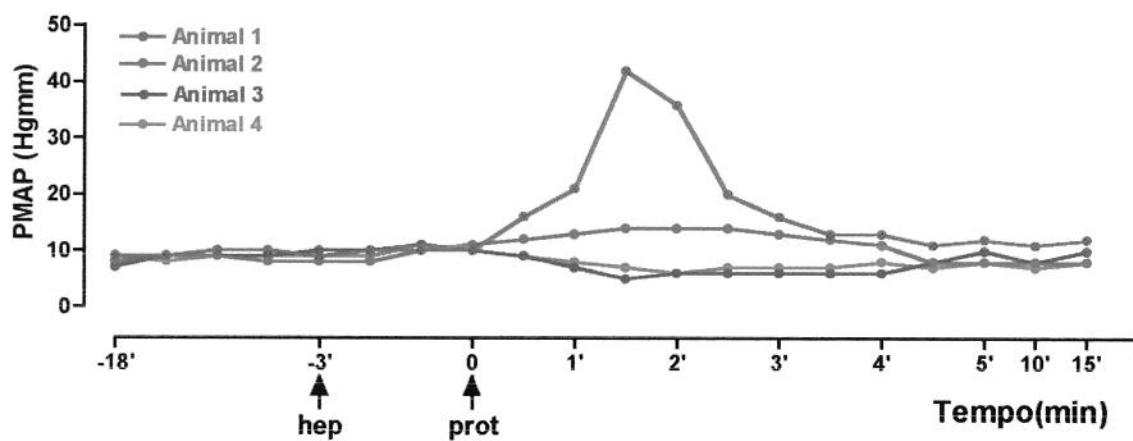


Figura 4: Valores individuais da Pressão Média da Artéria Pulmonar em cães submetidos a injeção de 500 UI/Kg de heparina, 3 min antes da injeção da protamina (5 mg/Kg). **hep**, Heparina; **prot**, protamina; **PMP**, pressão média da artéria pulmonar.

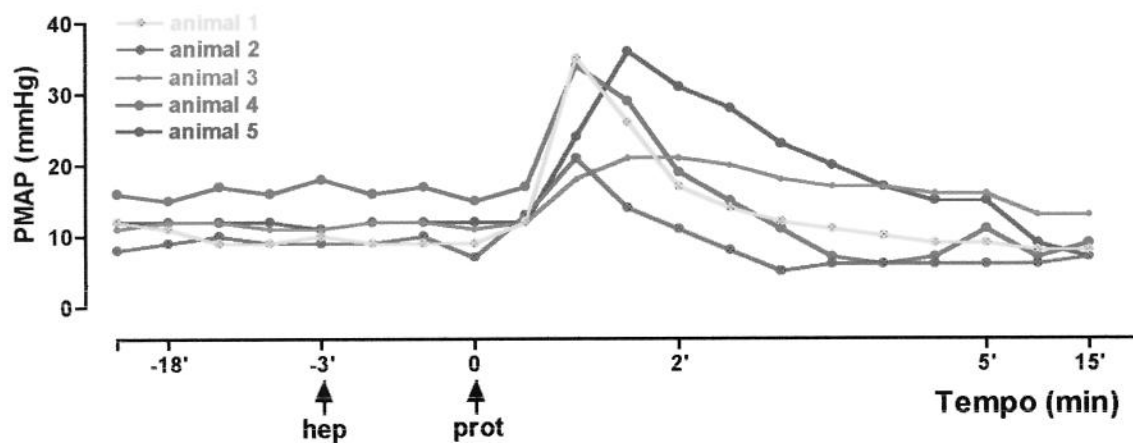


Figura 5 : Valores individuais da Pressão Média da Artéria Pulmonar em cães submetidos a injeção de 500 UI/Kg de heparina, 3 min antes da injeção da protamina (10 mg/Kg). **hep**, Heparina; **prot**, protamina; **PMAP**, pressão média da artéria pulmonar.

3.2. Alterações Hemodinâmicas induzidas pelo Complexo Heparina-Protamina

A administração de 500 UI/Kg de heparina, 3 min antes da protamina (10 mg/Kg), causou um aumento de aproximadamente 280% da pressão média da arterial pulmonar (PMAP) o qual foi acompanhado por um aumento significativo do gradiente transpulmonar (Fig. 6 A e B). O aumento da pressão média da arterial pulmonar e do gradiente transpulmonar foi significativo aos 30 – 60 seg após a administração da protamina, decaindo para os valores basais após 2 min da administração desta droga.

Concomitante à hipertensão pulmonar, observamos uma queda significativa da pressão arterial média (PAM), observada até aproximadamente 15 min após administração da protamina (Fig. 6 C). Além disso, observamos um aumento significativo da frequência cardíaca (FC) com queda acentuada do volume sistólico (VS) e do débito cardíaco (IC) (Fig. 6 D, Fig. 7 E e F). O índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) não sofreu alterações significativas (Fig. 7 G).

Nos cães que receberam salina no lugar da protamina (ou no lugar da heparina) não detectamos alterações significativas de nenhum dos parâmetros hemodinâmicos estudados (Fig. 6 A-D, Fig. 7 E-G).

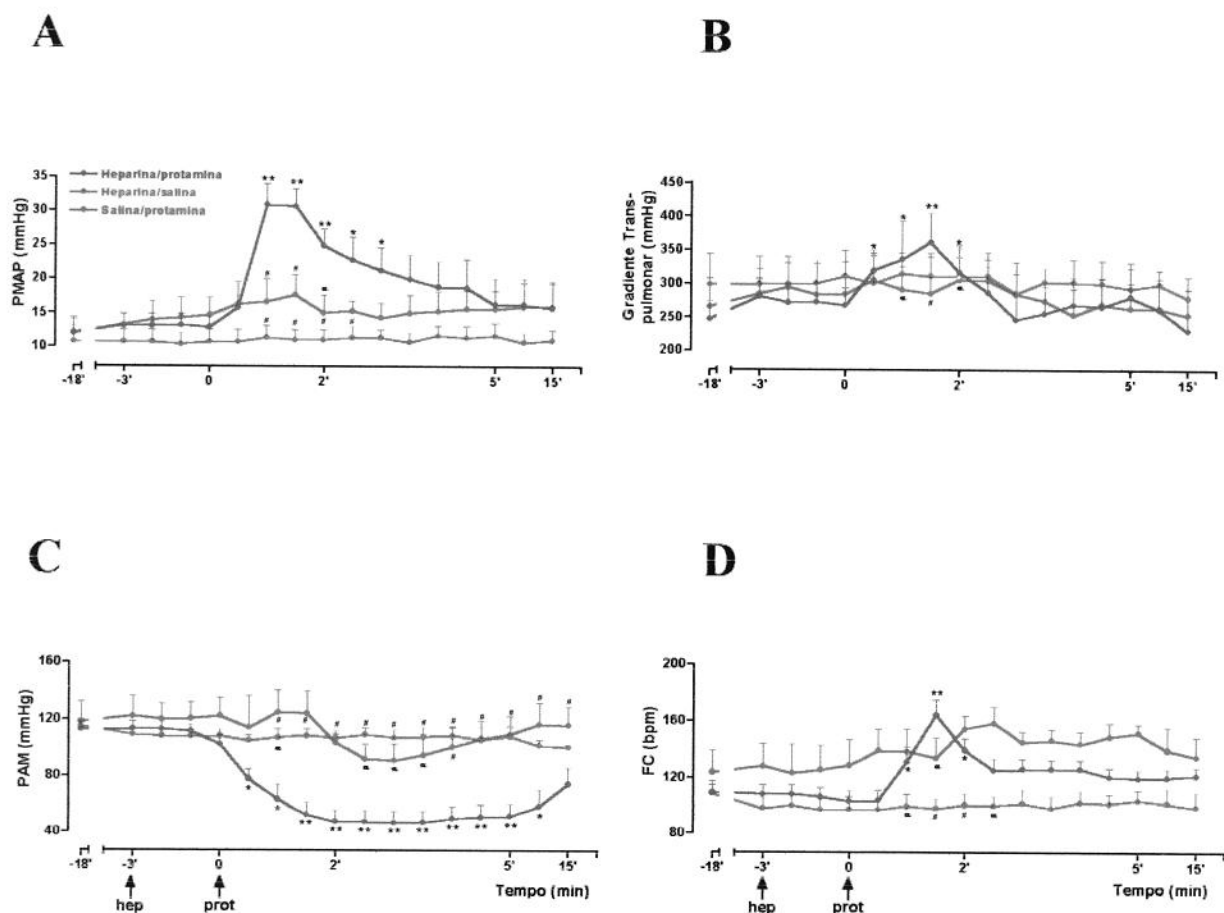
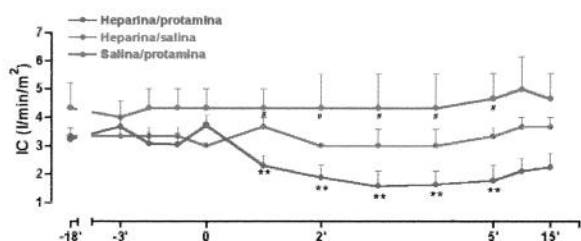


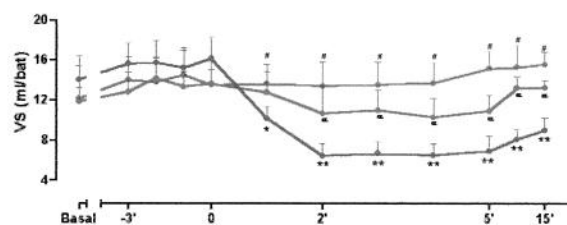
Figura 6: Alterações Hemodinâmicas Induzidas pelo Complexo Heparina-Protamina.

A) Pressão média da artéria pulmonar (PMAP); B) Gradiente transpulmonar; C) Pressão arterial sistêmica média (PAM); D) Frequência cardíaca (FC). Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para n animais, Heparina (**hep**); protamina (**prot**), heparina/protamina ($n=12$), heparina/salina ($n=3$), salina/protamina ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ em relação ao basal (-3 min), $^{\#}P<0.05$, $^{\#}P<0.01$ em relação ao grupo heparina/protamina.

E



F



G

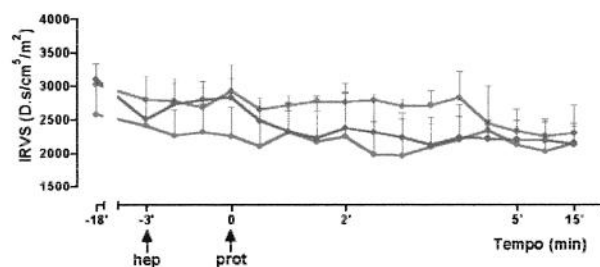


Figura 7: Alterações Hemodinâmicas Induzidas pelo Complexo Heparina–Protamina.

E) Índice cardíaco (IC); F) Volume sistólico (VS); G) Índice de resistência vascular sistêmica (IRVS). Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para n animais Heparina (**hep**); protamina (**prot**), heparina/protamina ($n=12$), heparina/salina ($n=3$), salina/protamina ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ em relação ao basal (-3 min), $^{\square}P<0.05$, $^{\#}P<0.01$ em relação ao grupo heparina/protamina.

3.3 Efeitos dos Tratamentos com Indometacina, Dazoxibeno e Tezosentan

Nos animais pré-tratados com indometacina (10 mg/Kg), observamos que o aumento da pressão média da arterial pulmonar e do gradiente transpulmonar decorrentes da interação heparina-protamina foram marcadamente reduzidos em relação ao grupo controle (Fig. 8 e 9, respectivamente). A queda da PAM no grupo indometacina foi de mesma magnitude do grupo controle; porém notamos normalização da PAM aos 4 min após administração de protamina (Fig. 10). O aumento da frequência cardíaca foi significativamente atenuado por este tratamento e a queda do IC não foi alterada de maneira significativa exceto no tempo de 2 min após a protamina (Fig. 11 e 12). O IRVS não apresentou alterações significativas (Fig. 13).

O tratamento dos cães com dazoxibeno (10 mg/Kg) preveniu significativamente o aumento de pressão média da arterial pulmonar (Fig. 8) e o gradiente transpulmonar (Fig. 9). Por outro lado, é interessante notar que este tratamento potencializou discretamente a queda de pressão arterial nos tempos 1.5, 2, 2.5, 3 min após a administração de protamina (Fig. 10). O aumento da frequência cardíaca e queda do IC não sofreram modificações em relação ao grupo controle (Figs. 11 e 12). O IRVS não apresentou alterações significativas (Fig. 13).

O tratamento com tezosentan (10 mg/kg bolus + 10 mg/Kg/h infusão) reduziu significativamente o aumento da pressão média da arterial pulmonar apenas no intervalo de 1.0 – 1.5 min após administração da protamina, após o qual os valores mantiveram-se iguais aos do grupo controle (Fig. 8). No tempo de 1 min após a administração de

protamina, o valor do gradiente transpulmonar também mostrou-se significativamente reduzido pelo tezosentan (Fig. 9). A queda do PAM não sofreu alterações significativas nos animais tratados com tezosentan (Fig. 10). O aumento da frequência cardíaca foi atenuado, embora não de forma significativa, por este tratamento (Fig. 11) ao passo que a queda de débito cardíaco (Fig. 12) atenuou significativamente. O IRVS não apresentou alterações significativas (fig. 13).

Um grupo separado de cães foi usado para a verificação da eficácia do tratamento com o tezosentan frente à administração exógena da ET-1. Neste grupo observamos que, nos primeiros 5 min após a administração da ET-1 (20 µg/Kg, i.v.), a pressão média da arterial pulmonar aumentou significativamente enquanto a PAM sofreu queda significativa (Figs 14 A e B). Aos 30 min da administração da ET-1, a PAM encontrava-se significativamente elevada, sem alteração da pressão média da arterial pulmonar. No animais tratado com tezosentan, nenhuma alteração significativa de pressão média da arterial pulmonar e PAM foram observadas, quer aos 5 min quer aos 30 min (Fig. 14), indicando que, na dose administrada, este composto foi eficaz em bloquear os receptores ET_A.

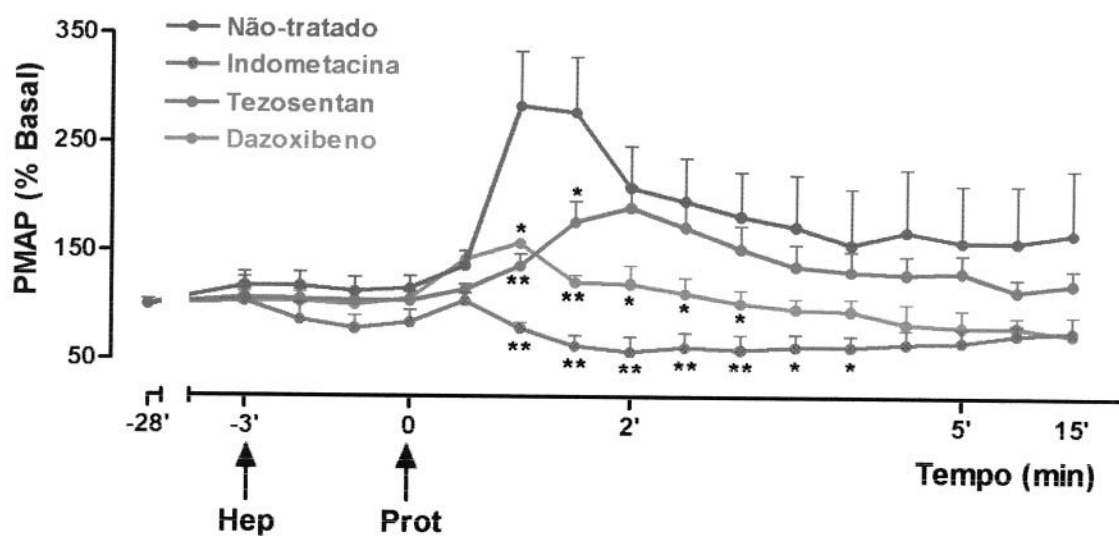


Figura 8: Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), Indometacina (n=6), Tezosentan (n=7) e Dazoxibeno (n=5). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.. *P<0.05, **P<0.01 em relação ao grupo não-tratado.

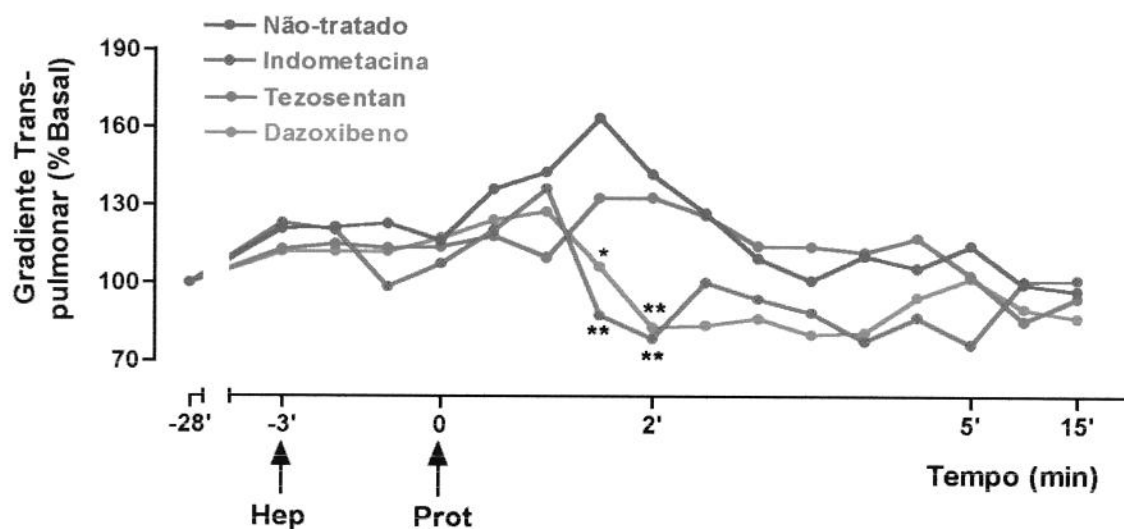


Figura 9: Gradiente Transpulmonar (% de variação dos valores basais).

Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 minutos antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), Indometacina (n=6), Tezosentan (n=7) e Dazoxibeno (n=5). O EPM do gráfico foi omitido para fim de clareza no gráfico.

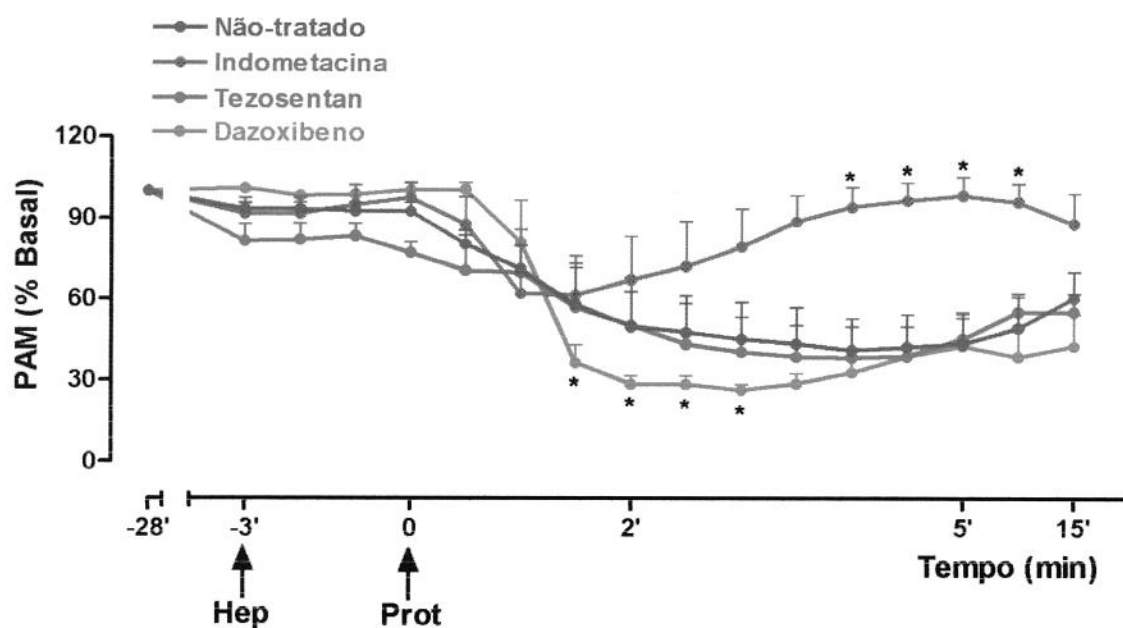


Figura 10: Pressão Arterial Sistêmica Média (PAM – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), Indometacina (n=6), Tezosentan (n=7) e Dazoxibeno (n=5). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.. *P<0.05, em relação ao grupo não-tratado

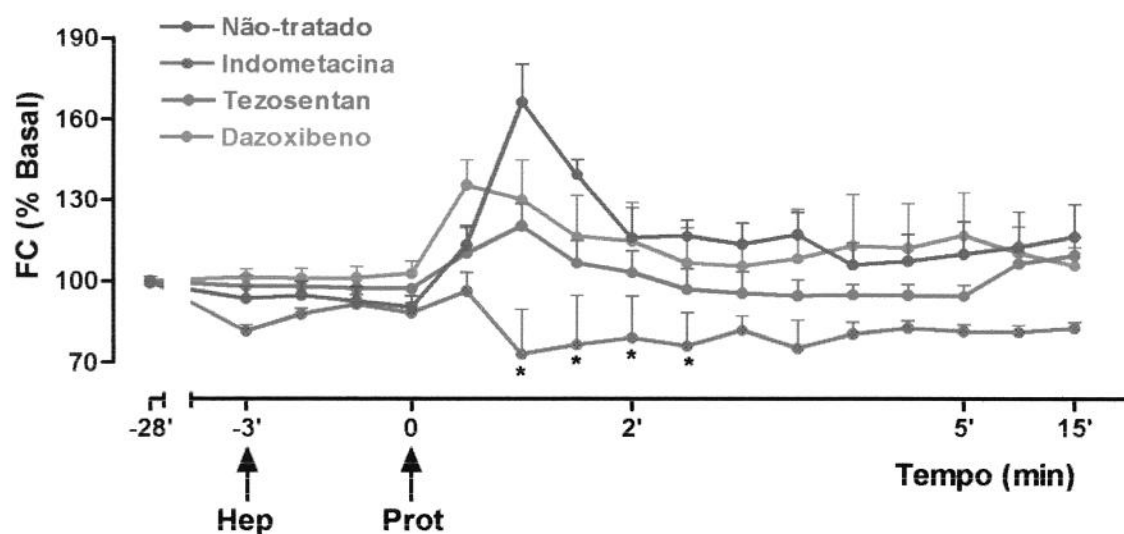


Figura 11: Frequência Cardíaca (FC – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), Indometacina (n=6), Tezosentan (n=7) e Dazoxibeno (n=5). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.. *P<0.05, em relação ao grupo não-tratado

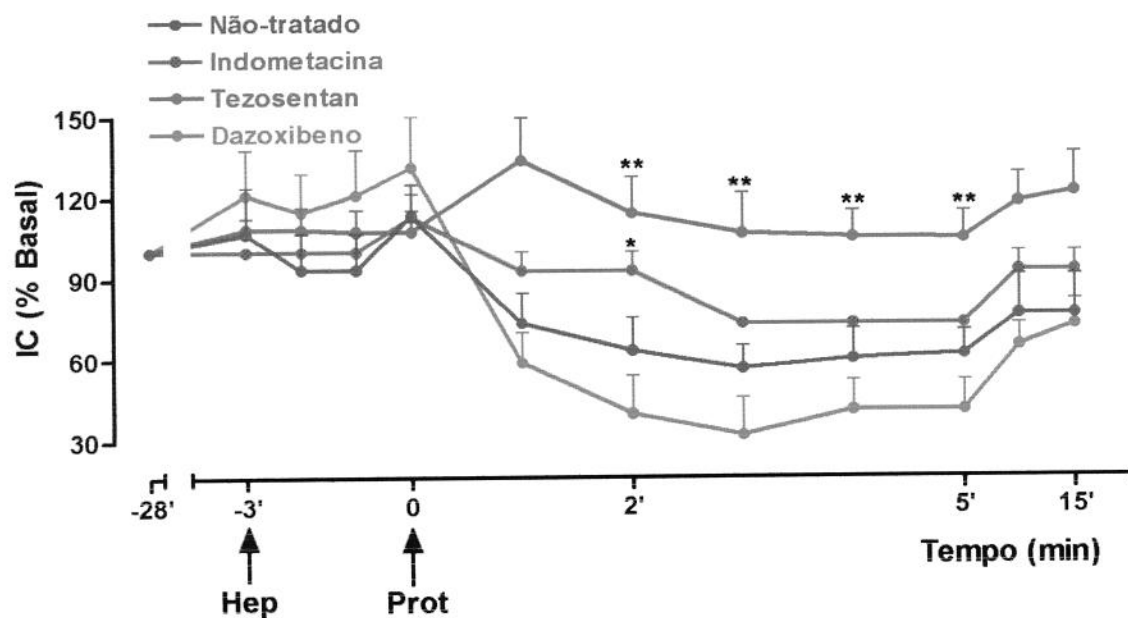


Figura 12: Índice Cardíaco (IC – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), Indometacina (n=6), Tezosentan (n=7) e Dazoxibeno (n=5). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.. *P<0.05, **P<0.01 em relação ao grupo não-tratado.

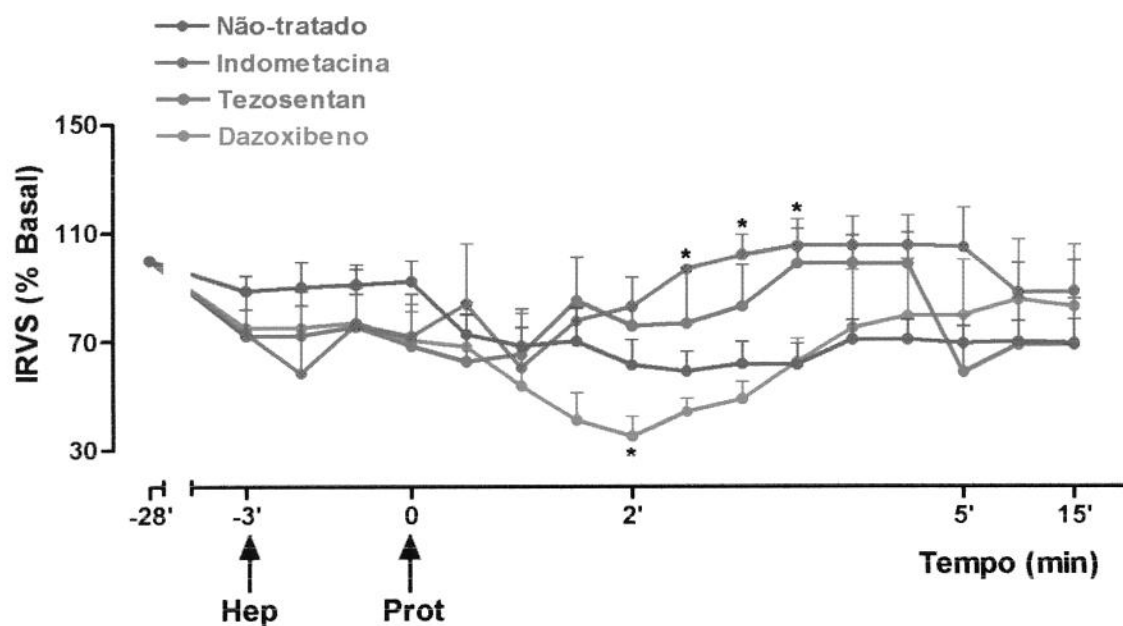
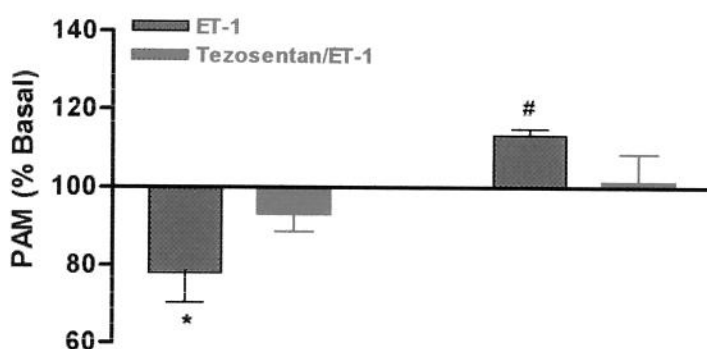


Figura 13: Índice Resistência Vascular Sistêmica (IRVS – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), Indometacina (n=6), Tezosentan (n=7) e Dazoxibeno (n=5). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.

A



B

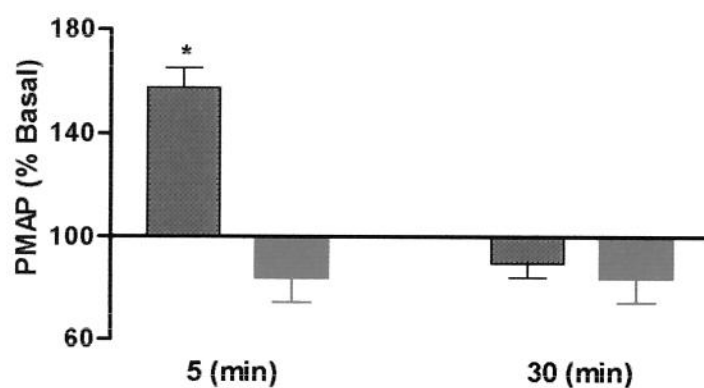


Figura 14: Alterações Hemodinâmicas (% de variação) Induzidas pela Administração de ET-1 (20 µg/Kg, i.v.) na Ausência e Presença de Tratamento com Tezosentan (10 mg/Kg bolus + 10 mg/Kg/h i.v. infusão). A) Pressão arterial sistêmica média (PAM); B) Pressão média da arterial pulmonar (PMAP). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. para 3 animais. *P<0.05 em relação ao basal; #P<0.05 em relação aos valores de 5 min.

3.4. Efeito do Tratamento com Óxido Nítrico (NO) Inalatório

O tratamento dos cães com o NO inalatório (3 ppm) reduziu significativamente o aumento da pressão média da arterial pulmonar e do gradiente transpulmonar induzido pelo complexo heparina–protamina (Fig. 15 e 16). Além disso, esse tratamento acentuou discretamente a queda da pressão arterial principalmente aos 1,5 e 2 min após a protamina (Fig. 17). A taquicardia foi atenuada significativamente (Fig. 18). O débito cardíaco e o IRVS não foram alterados significativamente pelo NO inalatório (Fig. 19 e 20).

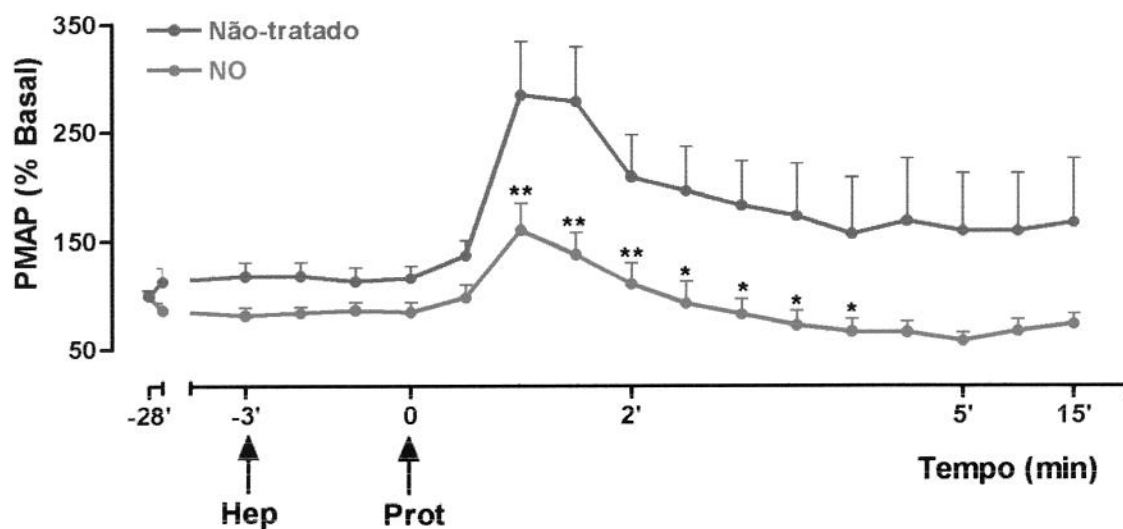


Figura 15: Pressão Média da Artéria Pulmonar (PMAP – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 minutos antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), NO (n=6). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.. *P<0.05, **P<0.01 em relação ao grupo não-tratado.

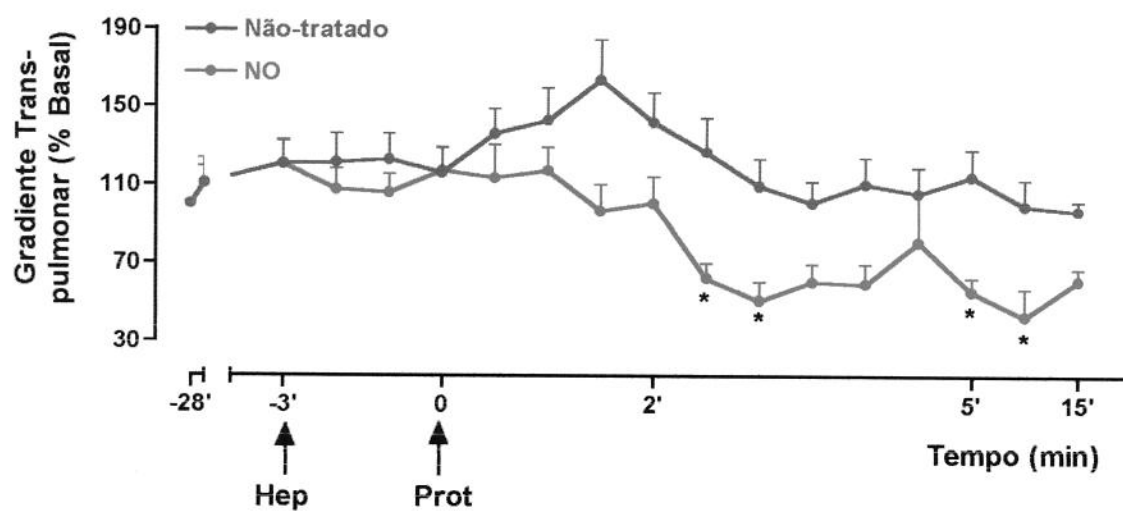


Figura 16: Gradiente Trans-Pulmonar (% de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/kg) para os grupos Não-tratado (n=12), NO (n=6). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.. *P<0.05, em relação ao grupo não-tratado

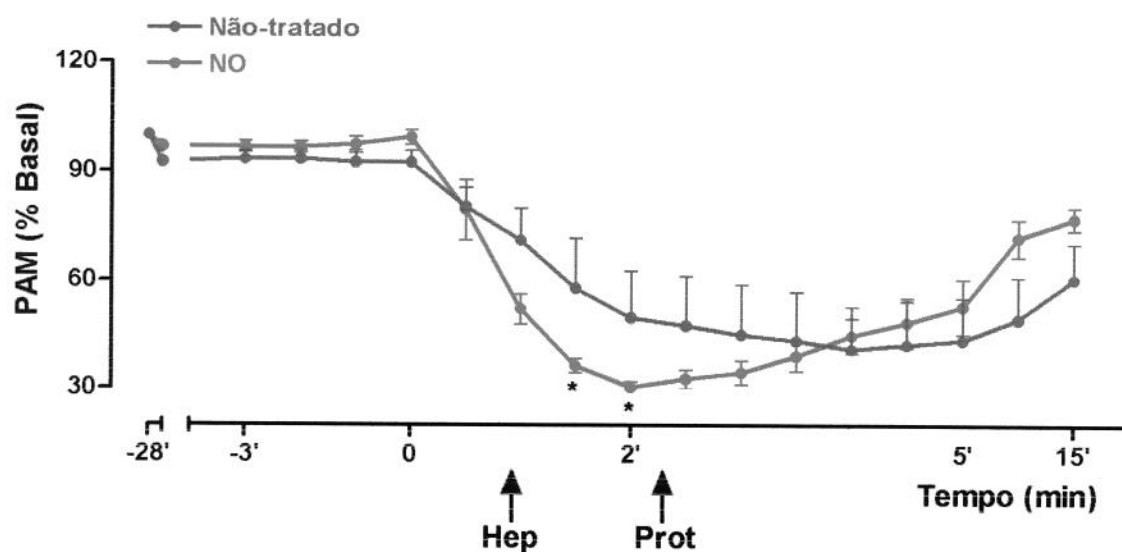


Figura 17: Pressão Arterial Sistêmica Média (PAM – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), NO (n=6). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M., onde * $P < 0,05$.

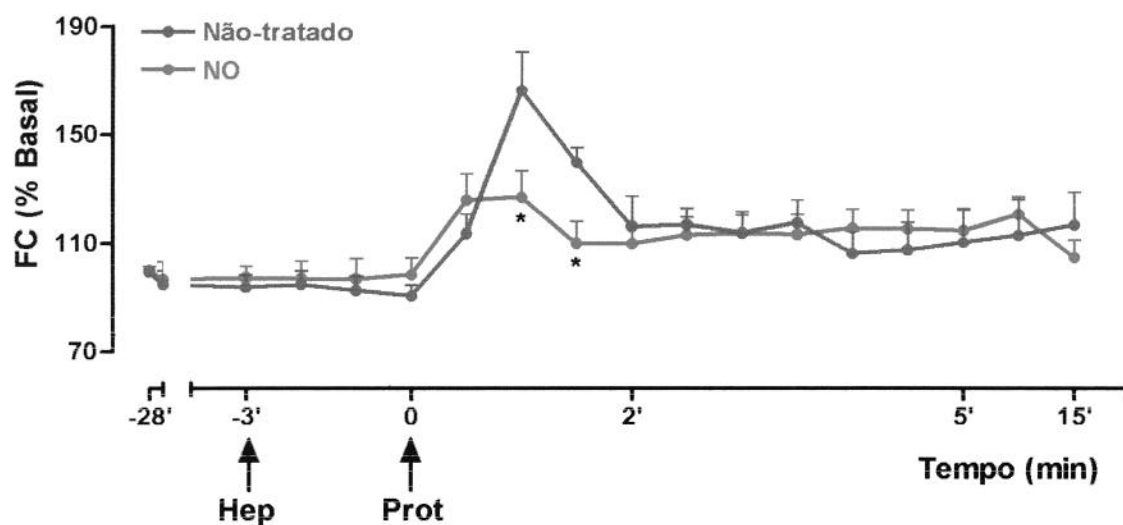


Figura 18: Frequência Cardíaca (FC – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), NO (n=6). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M., onde * $P < 0,05$.

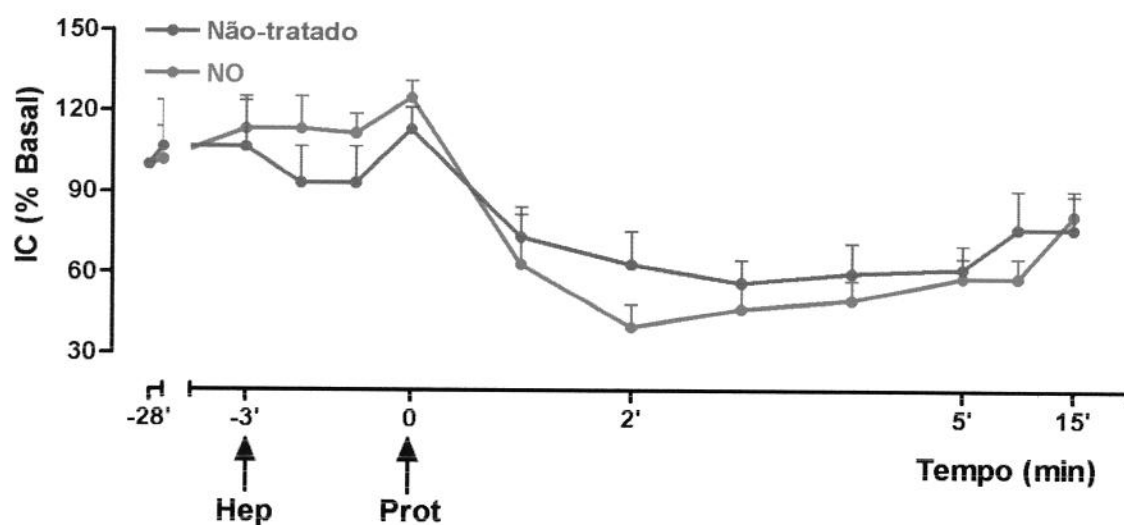


Figura 19: Índice Cardíaco (IC – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/kg) para os grupos Não-tratado (n=12), NO (n=6). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.

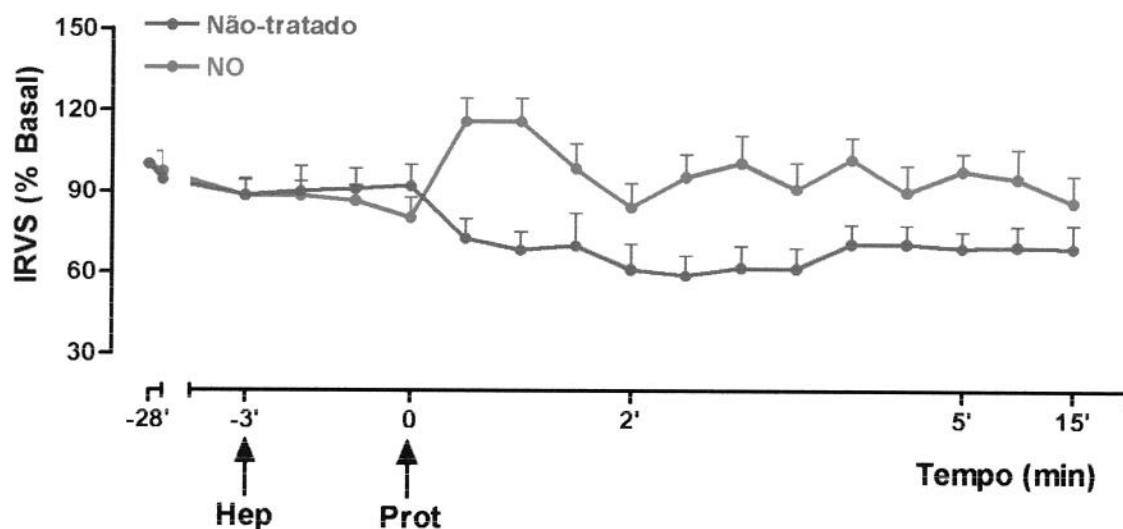


Figura 20: Índice Resistência Vascular Sistêmica (IRVS – % de variação dos valores basais). Administração de heparina (500 UI/Kg) foi realizada 3 min antes de protamina (10 mg/KG) para os grupos Não-tratado (n=12), NO (n=6). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.

3.5. Níveis Plasmáticos de Tromboxano B₂

Os níveis de TxB₂ encontraram-se significativamente elevados 2 min após a administração da protamina, mantendo-se elevados até o final do experimento (15 min). Com a administração da indometacina, observamos uma total prevenção da liberação de TxB₂ durante a formação do complexo heparina–protamina (Fig. 21).

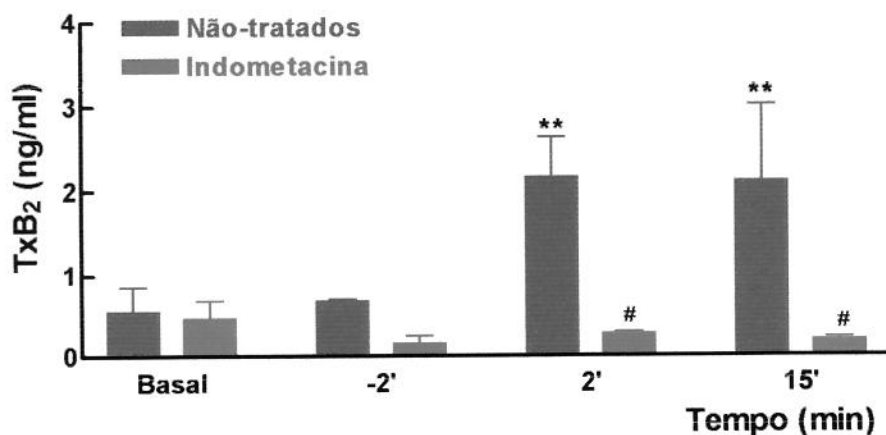


Figura 21: Níveis Plasmáticos de Tromboxano B₂ em Cães Não-tratado (n=12) e tratados com indometacina (n=6) na vigência da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina–protamina. O nível basal refere-se à concentração plasmática de TxB₂ antes da administração da heparina. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para *n* animais. **P<0.01 em relação ao basal e #P<0.01 em relação ao grupo não-tratado.

3.6. Gasometria Arterial

A hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina–protamina e os tratamentos não modificaram significativamente a pO_2 e pCO_2 no sangue arterial em animais ventilados com ar ambiente ($FiO_2 = 21\%$) (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados

Tabela 1. Gasometria Arterial de Cães Anestesiados e Ventilados com ar Ambiente ($\text{FiO}_2 = 21\%$). As análises foram realizadas antes da administração das drogas (basal) e 2 min após a administração da protamina, para os grupos Não-tratado (n=12), Tezosentan (n=7) e Dazoxibeno (n=5). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M.

	Basal		2 min após protamina	
	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	pCO ₂ (mmHg)
Controle	100,4 $\pm$ 4,6	32,1 $\pm$ 3,3	116,0 $\pm$ 8,0	35,7 $\pm$ 4,0
Dazoxibeno	98,5 $\pm$ 8,9	29,8 $\pm$ 3,5	100,0 $\pm$ 8,3	28,6 $\pm$ 3,9
Tezosentan	94,7 $\pm$ 3,7	28,9 $\pm$ 4,5	108,3 $\pm$ 9,6	30,7 $\pm$ 2,9

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese mostraram claramente que a interação in vivo da heparina com a protamina desencadeia hipertensão pulmonar marcante e rápida em cães anestesiados. Concomitantemente à hipertensão pulmonar, observamos um aumento significativo da resistência vascular pulmonar (demonstrado pela elevação do gradiente transpulmonar) e da frequência cardíaca e queda da pressão arterial sistêmica média, do débito cardíaco e do volume sistólico. Embora não tenhamos ainda explicação clara para todos estas variações hemodinâmicas que acompanham a hipertensão pulmonar, podemos descartar que a queda prolongada da pressão arterial sistêmica média seja consequência de redução da resistência vascular sistêmica, visto que o IRVS não alterou significativamente ao longo do período de observação. Na verdade, detectamos uma discreta queda do IRVS que parece não justificar a prolongada hipotensão arterial. É possível que a queda do débito cardíaco contribua majoritariamente para a hipotensão arterial nos cães submetidos ao complexo heparina-protamina. Este parâmetro cardiovascular é resultado de duas variáveis hemodinâmicas: frequência cardíaca (que mostrou-se elevada durante a hipertensão pulmonar) e o volume sistólico (que mostrou-se marcadamente reduzido durante a hipertensão pulmonar). Nossos resultados sugerem então que o volume sistólico é uma variável importante que está determinando a queda do débito cardíaco e da pressão arterial sistêmica. Uma possível explicação para a queda do volume sistólico poderia ser a ação do complexo heparina-protamina diretamente no coração (efeito inotrópico negativo), como consequência de redução temporária do fluxo no ventrículo esquerdo. A taquicardia nos parece ser um reflexo da hipotensão sistêmica.

O tromboxano A₂ é um agente vasoconstritor derivado do ácido araquidônico pela

ação da ciclooxygenase em plaquetas e outros elementos sanguíneos (Hamberg *et al.*, 1975). O tromboxano A_2 tem sido implicado na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina em ovelhas (MONTALESCOT *et al.*, 1990b). Estudos em porcos utilizando antagonista de receptores de TxA_2 (BM 13.177) demonstraram que este composto previne a vasoconstrição pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina. Um segundo prostanóide com propriedades vasoconstritoras, o $PGF_{2\alpha}$, também apresentou aumento no plasma após administração da protamina, mas, aparentemente, este aumento não mostrou-se relacionado às alterações hemodinâmicas resultantes do complexo heparina-protamina (CONZEN *et al.*, 1989; JANSSENS *et al.*, 1985). Outros antagonistas de receptores de tromboxano A_2 tais como o L-670596, SQ 30741, EP 092 e Gr 32191 têm sido empregados na hipertensão pulmonar após a administração endovenosa de protamina. Entretanto, como estes compostos também inibem a agregação plaquetária, é questionado o seu benefício em situações onde a atividade plaquetária é fundamental para a manutenção da homeostasia (LUMLEY *et al.*, 1988; BOOTH *et al.*, 1989; MONTALESCOT *et al.*, 1990; NUTTALL *et al.*, 1991).

A indometacina é um inibidor da ciclooxygenase derivada do indol, sendo utilizada para o tratamento da artrite reumatóide, de osteoartrites e de artrite gotosa. Em estudos de vasoconstrição pulmonar hipoxêmica induzida por endotoxina (*E. coli*), a indometacina previne a queda inicial (relacionada com as prostaglandinas vasodilatadoras), mas não o aumento tardio da vasoconstrição pulmonar hipoxêmica (produzido principalmente pelos leucotrienos). O dazoxibeno é um inibidor da formação de tromboxano A_2 e parece aumentar a produção de PGI_2 (inibidor da agregação plaquetária e a da vasoconstrição)

(Fiddler e Lumley, 1990). Apesar disso, o dazoxibeno não altera a hemodinâmica sistêmica, o tempo de sangramento e a agregação plaquetária, bem como não produz melhora clínica em uma grande variedade de doenças vasculares, pulmonares, cardíacas e renais, hipertensão pulmonar e SARA (RAPT Investigators, 1994).

Em nossos experimentos, utilizamos a indometacina e o dazoxibeno para avaliar a importância do tromboxano A₂ na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina nos cães, onde observamos que os mesmos reverteram significativamente a hipertensão pulmonar.

Além disso, detectamos níveis séricos elevados de Tromboxano A₂ na hipertensão pulmonar, sendo que esses níveis se mantiveram elevados até o final do experimento. Animais tratados com indometacina apresentaram uma normalização dos níveis de Tromboxano A₂, confirmando a eficácia do tratamento. Estes dados reforçam a hipótese que realmente o tromboxano A₂ exerce papel importante na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina. O mecanismo pelo qual a interação heparina-protamina desencadeia a hipertensão pulmonar ainda não é conhecido, mas acredita-se que esteja relacionada ao fato de a molécula de protamina ser de natureza policatiónica, ou seja, a interação da molécula aniônica (heparina) com a molécula catiónica (protamina) levaria à ativação do metabolismo do ácido araquidônico em certos tipos celulares, incluindo plaquetas e macrófagos perivasculares pulmonares (WARNER *et al.*, 1986; STAUB, 1988; SCHAPIRA & CHRISTMAN, 1990).

Entretanto a fonte celular exata de produção deste medidor é ainda desconhecida (MOTALESCOT *et al.*, 1990b). A depleção de plaquetas circulantes com o uso de

anticorpos não preveniu o desenvolvimento da hipertensão pulmonar e o mesmo aumento dos níveis plasmáticos de tromboxano B₂ após a administração de heparina-protamina (MONTALESCOT *et al.*, 1989), excluindo as plaquetas como fonte de produção deste eicosanóide.

Níveis plasmáticos elevados de ET-1 têm sido relatados em pacientes com hipertensão pulmonar primária e secundária, e parecem correlacionar-se com a severidade da doença. Isto sugere o envolvimento da ET-1 nas fisiopatologias da hipertensão pulmonar (MACLEAN, 1998; HAY, 1998), tanto em adultos como em crianças (IVY *et al.*, 1998).

Este peptídeo ativa receptores ET_A e ET_B nas células da musculatura lisa vascular pulmonar causando respostas contráteis (HYSLOP & DE NUCCI. 1992). Estudo recente em cães anestesiados demonstrou que a hipertensão pulmonar, o aumento da resistência vascular pulmonar e dos níveis de tromboxano A₂ induzidos por embolia experimental são atenuados por antagonistas de receptores ET_A (JKC-301), mas não de ET_B (BQ-788). (TANUS-SANTOS *et al.*, 2000).

O tezosentan é um antagonista não seletivo de receptores de ET-1 (Clozel *et al.*, 1999; Takamura *et al.*, 2000; Tune *et al.*, 2000), apontado como um bom candidato para o tratamento de patologias agudas (Clozel *et al.*, 1999). Este antagonista inibe a contração de aorta de ratos induzida pela ET-1 *in vivo*, e reduz o efeito pressórico da big-endotelina, além de diminuir a concentração plasmática da ET-1 (Clozel *et al.*, 1999). Em ratos hipertensos, o tezosentan diminui a pressão arterial e previne a insuficiência renal aguda em modelos de ratos nefropatas (WILHELM *et al.*, 2001). Estudos prévios de hipoxemia crônica em pulmões de ratos mostram que o efeito vasoconstritor poderia ser atribuído à

ativação de receptores ET_A (Li *et al.*, 1994 a e b), o qual é associado ao aumento da expressão do RNAm destes receptores.

Em nossos experimentos, observamos que o tezosentan diminuiu significativamente a hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina–protamina. Notamos também reversão significativa na queda do débito cardíaco. Os outros parâmetros hemodinâmicos não foram alterados significativamente pelo tratamento com o tezosentan. Em conjunto, estes resultados sugerem que a ET-1 está implicada nas alterações hemodinâmicas desenvolvidas pelo complexo heparina–protamina em cães. O uso futuro de antagonistas seletivos para receptores ET_A ou ET_B poderia indicar o principal subtipo de receptores envolvidos em cada uma das alterações observadas. Estudos sobre o efeito da endotelina no miocárdio, demonstraram que a mesma possui efeito inotrópico positivo (KRAMER *et al.*, 1997) e que a mesma possui um papel importante no controle do fluxo coronário tanto em humanos como em animais (STEWART *et al.*, 1991a; GOODWIN & YACOUB, 2001). O fato do tromboxano A₂ ser liberado no tecido pulmonar explicaria a prevenção total da hipertensão pulmonar pela indometacina (e dazoxibeno), quando o próprio tezosentan reduz apenas parcialmente este efeito, fato de a ET-1 poder ter uma melhor atuação a nível de tecido cardíaco.

Estudos em cães tratados com L-NAME (inibidor da síntese de NO) demonstraram que tanto a função sistêmica como a pulmonar é modulada pela liberação de NO. O tratamento agudo com L-NAME desencadeia hipertensão pulmonar em cães acompanhada de aumento da resistência vascular pulmonar, resistência vascular sistêmica e queda do débito cardíaco e da frequência cardíaca (ZAPPELLINI *et al.*, 1996). Em nossos estudos, a

inalação de NO na vigência da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina atenuou significativamente a hipertensão pulmonar e o aumento da resistência vascular pulmonar. A queda da PAM e do débito cardíaco não foram significativamente alterados.

Estudos prévios demonstraram que a inalação de NO reverte a hipertensão pulmonar induzida tanto pelo complexo heparina-protamina quanto pela infusão de U46619 (análogo estável de tromboxano A₂) em carneiros (FROSTELL *et al.*, 1991). O NO inalatório reduz a pressão média da artéria pulmonar, sem reduzir a resistência vascular sistêmica (ROBERTS *et al.*, 1993_a). Comparando o efeito do NO com o de outro vasodilatador endotelial, a prostaciclina, demonstrou-se que o NO reduz seletivamente a pressão arterial pulmonar, causando melhora da oxigenação (BIGATELLO *et al.*, 1993; PAYEN *et al.*, 1993; GROVER *et al.*, 1993; WYSOCKI *et al.*, 1993). Em nossos estudos, observamos que a utilização de NO inalatório diminuiu significativamente a hipertensão pulmonar melhorando a resistência vascular pulmonar. ZAYER *et al.*, (1993) estudaram os efeitos do NO inalado (6 a 100 ppm) em modelos de hipertensão pulmonar persistente em neonatos de carneiros, e também relataram redução dose-dependente da resistência vascular pulmonar. Em conclusão, a interação *in vivo* do complexo da heparina-protamina leva a hipertensão pulmonar em cães anestesiados decorrente da liberação de tromboxano A₂ e ET-1. Antagonistas de receptores de ET-1 e inibidores da síntese de tromboxano A₂ (ou de ciclooxigenase) poderiam ser empregados terapeuticamente nos processos patológicos de hipertensão pulmonar. A inalação de NO durante a hipertensão pulmonar teria um efeito coadjuvante benéfico neste processo.

CONCLUSÃO

A hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina é mediada pela liberação de tromboxano A₂ e ET-1;

O tratamento dos animais com NO inalatório melhora (ou corrige) a hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina

ABSTRACT

In this study we investigated the pharmacological mechanisms underlying the pulmonary hypertension induced by the protamine-heparin complex in anaesthetized dogs. The animals were anaesthetized with pentobarbital sodium (Hypnoi, 30 mg/kg, i.v). Anaesthesia was maintained with a combination of fentanyl citrate (0.01 mg/kg/h, i.v) and diazepam (0.25 mg/kg/h, i.v). The administration of heparin (500 UI/kg) following protamine (10 mg/kg) lead to a marked increase in the pulmonary hypertension (280 %) accompanied by a significant increase in the transpulmonary gradient. This phenomenon was observed within 1-3 mins after protamine administration. We also observed significant decreases of mean arterial blood pressure, systolic volume and cardiac output, and a significant tachycardia. The index of systemic vascular resistance was not significantly altered. Arterial blood gas analysis showed that pO_2 and pCO_2 were not changed.

Dogs pre-treated with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (10 mg/kg) showed a reduction of the pulmonary hypertension and increased the transpulmonary gradient induced by the heparin-protamine complex. This treatment also attenuated the decrease of cardiac output and tachycardia. Similarly, pre-treatment of the animals with the thromboxane synthetase inhibitor dazoxiben (10 mg/kg) prevented the pulmonary hypertension and increased transpulmonary gradient. Moreover, this treatment was not able to affect the decrease of cardiac output and heart rate. The thromboxane A_2 levels were markedly increased after protamine (2 min) injection, and maintained elevated until the end of experiment protocol. Indomethacin pre-treatment abolished the thromboxane A_2 release. The mixed ET_A/ET_B endothelin receptor antagonist tezosentan (10 mg/kg bolus + 10 mg/kg/h infusion) decreased significantly the pulmonary hypertension, cardiac output and heart rate. In addition, NO inhalation (3 ppm) reduced the pulmonary hypertension and transpulmonary gradient. In summary, our data showed that the heparin-protamine complex administration induces pulmonary hypertension mediated by both thromboxane A_2 and endothelin -1 release

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDAEL-LATIF, A.A. & ZHANG, Y.W. Species differences in the effects of endothelin-1 on myo-inositol triphosphate accumulation, cyclic AMP formation and contraction of isolated iris sphincter of rabbit and other species. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, **32**: 2432-2438, 1991.
- ADAMS, F.G.; LEDINGHAM, I.M. The pulmonary manifestations of septic shock. **Clin. Radiol.**, **28**: 315-322, 1977.
- ADATIA, I.; THOMPSON, J.; LANDZBERG, M.; WESSEL, D.L. Inhaled nitric oxide in chronic obstructive lung disease. **Lancet**, **341**: 307-308, 1993.
- AL-KAISI, N.; PARRATT, J.R.; SIDDIQUI, H.H.; ZEITLIN, I.J. Feline endotoxin shock: effects of methylprednisolone on kininogen-depletion, on the pulmonary circulation and on survival. **Br. J. Pharmacol.**, **60**: 471-476, 1977.
- ARAI, H.; HORI, S.; ARAMORI, I.; OHKUBO, H. & MAKANISHI, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. **Nature**, **348**: 730-732, 1990.
- AVONTUUR, J.A.; BIEWENGA, M.; BUIJK, S.L.; KANHAI, K.J.; BRUINING, H.A. Pulmonary hypertension and reduced cardiac output during inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock. **Shock**, **9**: 451-454, 1998.
- BERGER, J.I.; GIBSON, R.L.; REDDING, G.J.; STANDAERT, T.A.; CLARKE, W.R.; TRUOG, W.E. Effect of inhaled nitric oxide during Group B streptococcal sepsis in piglets. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **147**: 1080-1086, 1993.
- BIATECKI, R. A.; FISHER, C.S.; MURDOCH, W.W.; BARTHLOW, H.G. Chronic hypoxia increases staurosporine sensitivity of pulmonary artery smooth muscle to endothelin-1. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, **11**: 159-163, 1998.

- BIGATELLO, L.M.; HURFORD, W.E.; KACMAREK, R.M. The hemodynamic and respiratory response of ARDS patients to prolonged nitric oxide inhalation. **Am. Rev. Respir. Dis. (abstr.)** **147**: A720, 1993.
- BLACK, S.M.; JOHNGEN, M.J.; SOIFER, S.J. Coordinated regulation of genes of the nitric oxide and endothelin pathways during the development of pulmonary hypertension in fetal lambs. **Pediatr. Res.**, **44**: 821-830, 1998.
- BOOTH, R.F.; HONEY, A.C.; LAD, N.; TUFFIN, D.P.; WADE, P.J. Inhibitory effect of a selective thromboxane A₂ receptor antagonist, EP 092, on platelet aggregation in whole blood *ex vivo* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, **96**: 395-405, 1989.
- CARTEAUX, J.P.; ROUX, S.; SIAGHY, M.; SCHJOTH, B.; DOLOFON, P.; BECHAMPS, Y.; MERTES, P.M.; VILLEMOT, J.P. Acute pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in pig: The role of endogenous endothelin. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, **15**: 346-352, 1999.
- CASEY, L.C.; FLETCHER, J.R.; ZMUDKA, M.I.; RAMWELL, P.W. Prevention of endotoxin-induced pulmonary hypertension in primates by the use of a selective thromboxane synthetase inhibitor, OKY 1581. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **222**: 441-446, 1982.
- CHANG SW, VOELKEL NF. Charge-related lung microvascular injury. **Am Rev Respir Dis**, **139(2)**:534-545, 1989.
- CHARGAFF, E.; OLSON, K.B. Studies on the chemistry of blood coagulation: VI. Studies on the action of heparin and other anticoagulants: The influence of protamine on the anticoagulant effect in vivo. **J. Biol. Chem.**, **122**: 153-167, 1937.

- CLOZEL, M.; RAMUZ, H.; CLOZEL, J. P.; BREU, V.; HESS, P.; LOFFLER, B. M.; COASSALO, P.; ROUX, S. Pharmacology of tezenton, new endothelin receptor antagonist designed for parenteral use. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **290**: 840-846, 1999.
- CODY, R.J.; HAAS, G. J.; BINKLEY, P. F.; CAPERS, Q.; KELLEY, R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. **Circulation**, **85**: 504-509, 1992.
- CONZEN, P.F.; HABAZETTL, H.; GUTMANN, R.; HOBBAHN, J.; GOETZ, A.E.; PETER, K.; BRENDDEL, W. Thromboxane mediation of pulmonary hemodynamic responses after neutralization of heparin by protamine in pigs. **Anesth. Analg.**, **68**: 25-31, 1989.
- CREMONA, G.; DINH XUAN, A.T.; HIGENBOTTAM, T.W. Endothelium derived relaxing factor and the pulmonary circulation. **Lung**, **169**: 185-202, 1991.
- D'ORIO, V.; LAMBERMONT, B.; DETRY, O.; KOLH, P.; POTTY, P.; GERARD, P.; MARCELLE, R. Pulmonary impedance and right ventricular-vascular coupling in endotoxin shock. **Cardiovasc. Res.**, **38**: 375-382, 1998.
- D'ORLEANS-JUSTE, P.; LIDBURY, P. S.; WARNER, T. D.; VANE, J. R. Intravascular big endothelin increases circulating levels of endothelin-1 and prostanoids in the rabbit. **Biochem. Pharmacol.**, **38**: R21-22, 1990.
- DE NUCCI, G.; GRYGLEWSKI, R.G.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. The receptor-mediated release of EDRF and PGI₂ from bovine aortic cells is coupled. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, **85**: 2334-2338, 1988b.

- DEGGES, R.D.; FOSTER, M.E.; DANG, A.Q.; READ, R.C. pulmonary hypertensive effect of heparin and protamine interaction: Evidence for thromboxane B₂ release from the lung. **Am. J. Surg.**, **154**: 696-699, 1987.
- DINH XUAN, A.T.; HIGENBOTTAM, T.W.; CLELLAND, C. A.; PEPKE-ZABA, J.; CREMONA, G.; BUTT, A.Y.; LARGE, S.R.; WELLS, F.C.; WALLWORK, J. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in chronic obstructive lung disease. **N. Engl. J. Med.**, **324**: 1539-1547, 1991.
- DOYLE, A.E. The Australian national blood pressure study. **Aust. Fam. Physician.** **10**: 558-559, 1981.
- EGAWA H, KASAHARA M, INOMATA Y, UEMOTO S, ASONUMA K, FUJITA S, KIUCHI T, HAYASHI M, YONEMURA T, YOSHIKAWA M, ADACHI Y, SHAPIRO JA, TANAKA K. Long-term outcome of living related liver transplantation for patients with intrapulmonary shunting and strategy for complications. **Transplantation.** **67(5)**: 712-717. 1999.
- EMOTO, N.; YANAGISAWA, M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. **J. Biol. Chem.**, **270**: 15262-15268, 1995.
- FAGAN, J.M.; REX, S.E.; HAYES-LICITRA, S.A.; WAXMAN, L. L-arginine reduces right heart hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **254**: 100-103, 1999.
- FARO, R.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; DONATO, J.L.; BOIN, I.; OPGENORTH, T.J.; WITHRINGTON, P.G; ZATZ, R.E.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Role of Endothelin ET_A and ET_B receptors in the arterial vasculature of the isolated canine liver. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **26**: S204-207, 1995.

- FIDDLER GI, LUMLEY P. Preliminary clinical studies with thromboxane synthase inhibitors and thromboxane receptor blockers. **Circulation**. **81(1 Suppl)**:I69-78; discussion I79-180. 1990
- FILEP, J.G.; ROUSSEAU, A.; FOURNIER, A.; SIROIS, P. Struture-activity relationship of analogues of endothelin-1: dissociation of hypotensive and pressor actions. **Eur. J. Pharmacol.** **220**: 263-266, 1992.
- FRANCO-CEREDA, A.; HOLM, P.; BRODIN, L.A.; LISKA, J., LARSEN, F.F. ET-1 infusion increases systemic vascular resistance and depresses cardiac output in patients with chronic hypoxaemia and pulmonary hypertension. **Scand. Cardiovasc. J.**, **33**: 151-156, 1999.
- FRATACCI, M.D.; DEFOUILLOY, C.; ANDRIVET, P. Responses to infusion of acetylcholine and inhalation of nitric oxide in patients with chronic obstructive lung disease and pulmonary hypertension. **Am. Rev. Respir. Dis.** **145 (abstr.)**: A722, 1992.
- FRATACCI, M.D.; FROSTELL, C.G.; CHEN, T-Y.; WAIN, J.C.JR.; ROBINSON, D.R.; ZAPOL, W.M. Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep. **Anesthesiology**, **75**: 990-999, 1991.
- FROSTELL, C.G.; BLOMQVIST, H.; HEDENSTIERNA, G.; LUNDBERG, J.; ZAPOL, W.M. Inhaled nitric oxide selective reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. **Anesthesiology**, **78**: 427-435, 1993.
- FROSTELL, C.G.; FRATACCI, M.D.; WAIN, J.C., G.; JONES, R.; ZAPOL, W.M. Inhaled nitric oxide: A selectively pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction **Circulation**, **83**: 2038-2047, 1991.

- GANZ W, DONOSO R, MARCUS HS, FORRESTER JS, SWAN HJ. A new technique for measurement of cardiac output by thermodilution in man. **Am J Cardiol.** Apr; 27(4):392-396, 1971.
- GATTINONI, L.; PESENTI, A.; BOMBINO, M. Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. **Anesthesiology**, **69**: 824-832, 1988.
- GIARDINA JB, GREEN GM, RINEWALT AN, GRANGER JP, KHALIL RA. Role of endothelin B receptors in enhancing endothelium-dependent nitric oxide-mediated vascular relaxation during high salt diet. **Hypertension** **37(2 Part.):** 516-523, 2001.
- GODFRAIND, T. Evidence for heterogeneity of endothelin receptor distribution in human coronary artery. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 1201-1205, 1993.
- GOLDIE, R.G.; KNOTT, P.G.; CARR, M.J.; HAY, D.W.P.; HENRY, P.J. The endothelins in the pulmonary system. **Pulmon. Pharmacol.**, **9**: 69-93, 1996.
- GOODWIN, A.T.; YACOUB, M.H. Role of endogenous endothelin on coronary flow in health and disease. **Coron. Artery Dis.**, **12**: 517-525, 2001.
- GOTO, K.; KASUYA, Y.; MATSUKI, N.; TAKUWA, Y.; KURIHARA, H.; ISHIKAWA, T.; KIMURA, S.; YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Endothelin activates the dihydropyridine-sensitive, voltage-dependent calcium channel in vascular smooth muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 3915-3918, 1989.
- GRANSTAM, E.; WANG, L.; BILL, A. Effects of endothelins (ET-1, ET-2 and ET-3) in the rabbit eye; role of prostaglandins. **Eur. J. Pharmacol.**, **194**: 217-223, 1991.
- GRASSI-KASSISSE, D.M.; FARO, R.; WITRINGTON, P.G.; ZATZ, R.; OPGENORTH, T.J.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Characterisation of functional endothelin receptors in canine isolated perfused spleen. **Eur. J. Pharmacol.**, **282**: 57-93, 1995.

- GROVER, R.; SMITHIES, M.; BIHARI, D. A dose profile of the physiological effects of inhaled nitric oxide in acute lung injury. **Am. Rev. Respir. Dis.** , **147** (abstr.): A350, 1993.
- HAGEDORN, H.C.; JENSEN, B.N.; KRARUP, N.B.; WODSTRUP, I. Landmark article Jan 18, 1936: Protamine insulinate. By H.C. Hagedorn, B.N. Jensen, N.B. Krarup, & I. Wodstrup. **JAMA**, **1984**: Jan 20, 251(3)389-392, 1936.
- HAY, D.W.P. Endothelin-1: An interesting peptide or an important mediator in pulmonary diseases. **Pulm. Pharmacol. Therap.**, **11**: 141-146, 1998.
- HEMSÉN, A. Biochemical and functional characterisation of endothelin peptides with special reference to vascular effects. **Acta Physiol. Scand. Suppl.**, **602**: 01-61, 1991.
- HERVE P, LEBREC D, BRENOT F, SIMONNEAU G, HUMBERT M, SITBON O, DUROUX P. Pulmonary vascular disorders in portal hypertension. **Eur Respir J.** **11**(5):1153-66, 1998.
- HOLM, P.; LISKA, J.; FRANCO-CERECEDA, A. The ETA receptor antagonist, BMS-182874 reduces acute hypoxic pulmonary hypertension in pigs in vivo. **Cardiovasc. Res.**, **37**: 765-771, 1998.
- HORIGUCHI, T.; ENZAN, K.; MITSUHATA, H.; MURATA, M.; SUZUKI, M. Heparin-protamine complexes cause pulmonary hypertension in goats. **Anesthesiology**, **83**: 786-791, 1995.
- HORROW, J.C. Protamine: A review of its toxicity. **Anesth. Analg.**, **64**: 348-361, 1985.
- HORSFIELD, K. Morphometry of the small pulmonary arteries in man. **Circulation** , **42**: 593-597, 1978..

- HU, S. L.; KIM, H.S.; JENG, A.Y. Dual action of endothelin-1 on the Ca^{2+} - activated K^{+} channel in smooth muscle cells of porcine coronary artery. **Eur. J. Pharmacol.** **194**: 31-36, 1991.
- HYSLOP S, DE NUCCI G. Vasoactive mediators released by endothelins. **Pharmacol Res.****26(3)**:223-42, 1992.
- INOUE, A.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; KASUYA, Y.; MIYACHI, T.; GOTO, K.; MASAKI, T. The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 2863-2867, 1989.
- IVY, D.D.; PARKER, T.A.; KINSELLA, J.P.; ABMAN, S.H. Endothelin A receptor blockade decreases pulmonary vascular resistance in premature lambs with hyaline membrane disease. **Pediatr. Res.**, **44**: 175-180, 1998.
- KASUYA, Y.; ISHIKAWA, T.; YANAGISAWA, M.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. Mechanism of contraction to endothelin in isolated porcine coronary artery. **Am. J. Physiol.**, **257**: H1828-835, 1989a.
- KIMURA, S.; KASUYA, Y.; SAWAMURA, T.; SHINIMI, O.; SUGITA, Y.; YANAGISAWA, M.; GOTO, K.; MASAKI, T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure activity relationship of big endothelin-1. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13** (supl. 5): s5-7, 1989.
- KINSELLA, J.P.; ABMAN, S.H. inhalational nitric oxide therapy for in persistent pulmonary hypertension of the newborn. **Pediatrics.**, **91**: 997-998, 1993.

- KINSELLA, J.P.; MCQUESTON, J.A.; ROSENBERG, A.A.; ABMAN, S.H. Hemodynamic effects of exogenous nitric oxide in ovine transitional pulmonary circulation. **Am. J. Physiol.**, **263**: H875-880, 1992.
- KINSELLA, J.P.; NEISH, S.R.; SHAFFER, E.; ABMAN, S.H. Low-dose inhalation nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. **Lancet.**, **340**: 819-820, 1992.
- KRAMER, B.K.; ITTNER, K.P.; BEYER, M.E.; HOFFMEISTER, H.M.; RIEGGER, G.A. Circulatory and myocardial effects of endothelin. **J. Mol. Méd.** **75(11-12)**: 886-890, 1997.
- KROWKA, MJ. Hepatopulmonary syndrome versus portopulmonary hypertension: distinctions and dilemmas. **Hepatology**. **25(5)**:1282-1284, 1997.
- KROWKA, MJ. Hepatopulmonary Syndrome and Liver Transplantation. **Liver Transpl.** **6(1)**:113-115, 2000a.
- KROWKA, MJ. Hepatopulmonary syndrome: recent literature (1997 to 1999) and implications for liver transplantation. **Liver Transpl.** **6(4 Suppl 1)**: S31-35, 2000b.
- KUWAHARA K, KITSUKAWA Y, SUZUKI Y, SAITO Y. Effects of several endothelin receptor antagonists on gastrointestinal transit of guinea pigs. **Dig Dis Sci** **45(5)**: 960-966, 2000.
- LAMBERMONT, B.; KOLH, P.; DETRY, O.; GERARD, P.; MARCELLE, R; D'ORIO, V. Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. **Cardiovasc. Res.**, **41**: 275-281, 1999.
- LI H, CHEN SJ, CHEN YF, MENG QC, DURAND J, OPARIL S, ELTON TS. Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. **J. Appl. Physiol.** **77(3)**:1451-1459, 1994.

- LI H, ELTON TS, CHEN YF, OPARIL S. Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung. **Am. J. Physiol.** **266(5 Pt 1):**L553-560. 1994.
- LI, J.X.; OLIVER, J.R.; LU, C.Y.; GRANTHAM, K.D.; PHILIPS, J.B. 3d. Age-related differences in responses to endotoxin infusion in unanesthetized piglets. **Circ. Shock**, **41**: 40-47, 1993.
- LOWENSTEIN, E. Lessons from studying an infrequent event: Adverse hemodynamic response associated with protamine reversal of heparin anticoagulation. **J. Cardiothorac. Anesth.**, **3**: 99-107, 1989.
- LOWENSTEIN, E.; LYNCH, K.; ROBIMSON, D.R.; FITZGIBBON, C.M.; ZAPOL, W. incidence, severity and causation of adverse cardiopulmonary response to protamine reversal of heparin anticoagulation in man. **Am. Ver. Respir. Dis.**, **137(suppl)**: 245, 1988.
- LUMLEY, P.; HUMPHREY, P.P.A.; WHITE, B.P. GR 32191, a novel thromboxane receptor blocking drug: Effects upon platelet and vascular and airways smooth muscle in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, **93**: 43p, 1988.
- LUTZ, J.; GORENFLO, M.; HAHIGHORST, M.; VOGEL, M.; LANGE, P.E., HOCHER, B. Endothelin-1 and endothelin-receptors in lung biopsies of patients with pulmonary hypertension due to congenital heart disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, **37**: 423-428, 1999.
- MACLEAN, R.M. Endothelin-1: a mediator of pulmonary hypertension? **Pulmon. Pharmacol. Therap.** **11**: 125-132, 1998.
- MARCINIAK, S.J.; PLUMPTON, C.; BARKER, P.J.; HUSKISSON, N.S.; DAVENPORT, A.P. Localization of immunoreactive endothelin and proendothelin in the human lung. **Pulm. Pharmacol.**, **5**: 175-182, 1992.

- MARTINEZ G, BARBERA JA, NAVASA M, ROCA J, VISA J, RODRIGUEZ-ROISIN R. Hepatopulmonary syndrome associated with cardiorespiratory disease. **J Hepatol.** **30(5)**:882-889, 1999.
- MATS HAMBERG, JAN SVENSSON, AND BENGT SAMUELSSON. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Nutrition classics. **Proc of the Natl Acad Sci USA**, **72(8)**: 2994-2998, 1975.
- MICHAEL, J.R.; MARKEWITZ, B.A. Endothelins and the lung. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.** **154**: 555-581, 1996.
- MONTALESCOT G, KREIL E, LYNCH K, GREENE EM, TORRES A, CARVALHO A, FITZGIBBON C, ROBINSON DR, LOWENSTEIN E, ZAPOL WM. Effect of platelet depletion on lung vasoconstriction in heparin-protamine reactions. **J. Appl. Physiol.** **66(5)**:2344-2350,. 1989.
- MONTALESCOT G, DROBINSKI G, MACLOUF J, LELLOUCHE F, ANKRI A, MOUSSALLEM N, EUGENE L, THOMAS D, GROSGOGEAT Y. Early thromboxane release during pacing-induced myocardial ischemia with angiographically normal coronary arteries. **Am Heart J.** **120(6 Pt 1)**: 1445-1447, 1990a.
- MONTALESCOT G, LOWENSTEIN E, OGLETREE ML, GREENE EM, ROBINSON DR, HARTL K, ZAPOL WM. Thromboxane receptor blockade prevents pulmonary hypertension induced by heparin-protamine reactions in awake sheep. **Circulation.** **82(5)**:1765-1777, 1990c.
- MONTALESCOT G, ZAPOL WM, CARVALHO A, ROBINSON DR, TORRES A, LOWENSTEIN E. Neutralization of low molecular weight heparin by polybrene prevents thromboxane release and severe pulmonary hypertension in awake sheep. **Circulation.** **82(5)**:1754-1764, 1990b.

- MOREL, P.R.; LOWENSTEIN, E.; NGUYENDUY, T.; ROBINSON, D.R.; REPINE, J.E.; CHENOWETH, D.E.; ZAPOL, W.M. Acute pulmonary vasoconstriction and thromboxane release during protamine reversal of heparin anticoagulation in awake sheep. Evidence for the role of reactive oxygen metabolites following nonimmunological complement activation. **Circ. Res.**, **62**: 905-915, 1988.
- MORELAND. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET_B-like receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **184**: 100-106, 1992.
- MURAMATSU, M.; OKA, M.; MORIO, Y.; SOMA, S.; TAKAHASHI, H.; FUKUCHI, Y. L 358-64 chronic hypoxia augments endothelin-B receptor-mediated vasodilation in isolated perfused rat lungs. **Am. J. Physiol.**, **276**: L358-364, 1999.
- NAVIN, D.M.; GROSS, N.J. Management of chronic obstructive pulmonary disease. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, **2**: 141-147, 1996.
- NUTTALL, G.A.; MURRAY, M.J.; WALTER BOWIE, E.J. Protamine-heparin-induced pulmonary hypertension in pigs: Effects of treatment with a thromboxane receptor antagonist on hemodynamics and coagulation. **Anesthesiology**, **74**: 138-145, 1991.
- OKAMURA, T.; MATSUMOTO, T.; IKEMOTO, F. & TODA, N. Mechanisms of the biphasic responses to endothelin-3 in dog coronary arteries. **Br. J. Pharmacol.**, **107**: 1037-1041, 1992.
- OLHSTEIN, E. H.; BECK, G. R. JR.; DOUGLAS, S. A.; NAMBI, P.; LAGO, M. A.; GLEASON, J. G.; RUFFOLO, R. R. JR.; FEUERSTEIN, G.; ELLIOTT, J. D. Non-peptide endothelin receptor antagonists. II: Pharmacological characterization of SB-209670. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **271**: 762-768, 1994.

- PARILLO, M.M.; ASHTON, D.S.; NATANSON, C.; SUFFREDINI, A.F.; DANNER, R.L.; CUNNION, R.E.; OGNIBENE, F.P. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. **Ann. Intern. Med.**, **113**: 227-242, 1990.
- PAYEN, D.; GATECEL, C.; GUINARD, N. Inhalation of low dose of nitric oxide (NO) and iv L-arg in ARDS: Effect on pulmonary hemodynamic, gas exchange and nitric oxide metabolites. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **147 (abstr.)**: A720, 1993.
- PEPKE-ZABA, J.; HIGENBOTTAM, T.W.; DINH-XUAN, A.T.; STONE, D.; WALLWORK, J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in pulmonary hypertension. **Lancet**, **338**: 1173-1174, 1991.
- PETROS, A.; LAMB, G.; LEONE, A.; MONCADA, S.; BENNETT, D.; VALLANCE, P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovasc. Res.**, **28**: 34-39, 1994.
- RAE, G.A.; TRYBULEC, M.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Endothelin-1 releases eicosanoids from the rabbit isolated perfused kidney and spleen. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13**: S89-92, 1989.
- RAPT INVESTIGATORS – THE RIDOGREL VERSUS ASPIRIN PATENCY TRIAL. Randomized trial of ridogrel, a combined thromboxane A₂ synthase inhibitor and thromboxane A₂/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, versus aspirin as adjunct to thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. **Circulation**, **89(2)**: 588-595, 1994.
- RESINK, T.J.; SCOTT-BURDEN, T.; BUHLER, F.R. Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **157**: 1360-1368, 1988.

- RICH, G.F.; MURPHY, G.D.JR.; ROOS, C. M.; JOHNS, R.A. Inhaled nitric oxide. Selective pulmonary vasodilation in cardiac surgical patients. **Anesthesiology**, **78**: 1028-1035, 1993.
- ROBERTS, J.D.JR.; CHEN, T-Y.; KAWAI, N. Inhaled nitric oxide reverses pulmonary vasoconstriction in the hypoxic and acidotic newborn lamb. **Circ. Res.**, **72**: 246-254, 1993a.
- ROBERTS, J.D.JR.; LANG, P.; BIGATELLO, L.M.; VLAHAKES, G.J.; ZAPOL, W.M. Inhaled nitric oxide in congenital heart disease. **Circulation**, **87**: 447-453, 1993b.
- ROBERTS, J.D.JR.; POLANER, D.M.; LANG, P.; ZAPOL, W.M. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn **Lancet.**, **340**: 818-819, 1992.
- ROSSAINT, R.; FALKE, K.F.; LOPEZ, F.; SLAMA, K.; PISON, V.; ZAPOL, W.M. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. **N. Engl. J. Med.**, **328**: 399-405, 1993.
- SCHAPIRA, M.; CHRISTMAN, W. Neutralization of heparin by protamine. Time for a change? **Circulation**, **82**: 1877-1879, 1990.
- SCHIFFRIN EL. Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. **J Hypertens** **16(12 Pt 2)**:1891-51998
- SCOTT VL, DODSON SF, KANG Y. The hepatopulmonary syndrome. **Surg. Clin .North. Am.** **79(1)** vii: 23-41, 1999.
- SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M.; TANZAWA, K. Cloning and functional expression of endothelin- converting enzyme from rat endothelial cells. **J. Biol. Chem.**,**269**: 18275-18278, 1994.

- SOMA, S.; TAKAHASHI, H.; MURAMATSU, M.; OKA, M.; FUKUCHI, Y. Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, **20**: 620-630, 1999.
- STAUB NC., Pulmonary intravascular macrophages. **Chest**; **93 (3 Suppl)**:84S-85S 1988
- STEFANISZYN, H.J.; NOVICK, R.J.; SALERNO, T.A. Toward a better understanding of the hemodynamic effects of protamine and heparin interaction. **J. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, **87**: 678-686, 1984.
- STEWART, D.J.; KUBAC, G.; COSTELLO, K.B.; CERNACEK, P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, **18**: 38-43, 1991a.
- TAKAMURA M, PARENT R, CERNACEK P, LAVALLEE M. Influence of dual ET(A)/ET(B)-receptor blockade on coronary responses to treadmill exercise in dogs. **J Appl Physiol.** **89(5)**:2041-2048,. 2000.
- TANUS-SANTOS JE, GORDO WM, UDELSMANN A, CITTADINO MH, MORENO H JR. Nonselective endothelin-receptor antagonism attenuates hemodynamic changes after massive pulmonary air embolism in dogs. **Chest.** **118(1)**:175-179, 2000.
- TUNE JD, RICHMOND KN, GORMAN MW, OLSSON RA, FEIGL EO. Adenosine is not responsible for local metabolic control of coronary blood flow in dogs during exercise. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** **278(1)**:H74-84. 2000.
- TUTAR, H.E.; IMAMOGLU, A.; ATALAY, S.; GUMUS, H.; AKAR, N. Plasma endothelin-1 levels in patients with left-to-right shunt with or without pulmonary hypertension. **Int. J. Cardiol.**, **70**: 57-61, 1999.

- UNDERWOOD, D.C.; BOCHNOWICZ, S.; OSBORN, R.R.; LUTTMANN, M.A.; LOUDEN, C.S.; HART, J.K.; OLLIOTT, J.D.; HAY, D.W. Effects of SB 217242 on hypoxia-induced cardiopulmonary changes in the high altitude-sensitive rat. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, **12**: 13-26, 1999.
- WANECEK M.; RUDEHILL, A.; HEMSEN, A.; LUNDBERG, J.M.; WEITZBERG, E. The endothelin receptor antagonist, bosentan, in combination with the cyclooxygenase inhibitor, diclofenac, counteracts pulmonary hypertension in porcine endotoxin shock. **Crit. Care. Med.**, **25**: 848-857, 1997.
- WANSTALL, J.C.; JEFFERY, T.K. Recognition and management of pulmonary hypertension. **Drugs**, **56**: 989-1007, 1998.
- WARNER, A.E.; BARRY, B.E.; BRAIN, J.D. Pulmonary intravascular macrophages in sheep. Morphology and function of a novel constituent of the mononuclear phagocyte system. **Lab. Invest.** **55**: 276-288, 1986.
- WARNER, T.D.; ALLCOCK, G. H.; CORDER, R. & VANE, J.R. Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF. **Br. J. Pharmacol.**, **110**: 777-782, 1993a.
- WARNER, T.D.; ALLCOCK, G. H.; CORDER, R.; MICKLEY, E. J. & VANE, J.R. Comparative studies the endothelin receptors antagonists BQ-123 and PD 142893 indicate at least three endothelin receptors. **J. Cardiol. Pharmacol.**, **22**: S117-S119, 1993b.
- WARNER, T.D.; DE NUCCI, G.; VANE, J.R. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, **159**: 325-326, 1989a.

- WARNER, T.D.;MICHELL, J.A.;DE NUCCI, G.;VANE, J.R. Endothelin-1 and endothelin-3 release EDRF from isolated perfused arterial vessels of the rat and rabbit. **J. Cardivasc.Pharmacol.**, **13**: s85-88, 1989b.
- WILHELM SM, STOWE NT, ROBINSON AV, SCHULAK JA. The use of the endothelin receptor antagonist, tezosentan, before or after renal ischemia protects renal function. **Transplantation** **27;71(2)**:211-216, 2001.
- WITHRINGTON, P.G.; DE NUCCI, G. VANE, J.R. endothelin-1 causes vasoconstriction and vasodilatation in blood perfused liver of the dog. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **13**: S209-210, 1989.
- WYSOCKI, M.; VIGNON, P.; ROUPIE, E. Improvement in right ventricular function with inhaled nitric oxide in patients with the adult respiratory distress syndrome (ARDS) and permissive hypercapnia. **Am. Rev. Respir. Dis.**, **147 (abstr.)**: A350, 1993
- XU, D.; EMOTO, N.; GIADI, A.; SLAUGHTER, C.; KAW, S.; DE WIT, D.; YAMAMOTO, S.; BURMAN, H.P.; O'DONNELL, C.P.; CAHILL, P.A.; ROBOTHAM, J.L. Endothelin causes portal and pulmonary hyperension in porcine endotoxemic shock. **Am. J. Physiol.** **272**: H1239-1249, 1997.
- YAMAMOTO S, BURMAN HP, O'DONNELL CP, CAHILL PA, ROBOTHAM JL. Endothelin causes portal and pulmonary hypertension in porcine endotoxemic shock. **Am J Physiol.** **272 (3 Pt 2)**:H1239-249,1997.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSUI, Y.; YAZAKI, Y., GOTO, K., MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, **332**: 411-415, 1988.
- ZAPOL, W.M.; JONES, R. Vascular components of ARDS: Clinical pulmonary hemodynamics and morphology. **Am. Rev. Respir. Dis.** **136**: 471-474, 1987.

- ZAPOL, W.M.; SNIDER, M.T. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. **N. Engl. J. Med.** **296**: 476-480, 1977.
- ZAPPELLINI A, MORENO H JR, ANTUNES E, DE-NUCCI G. Evaluation of two different oxygen inspiratory fractions on the hemodynamic effects of N omega-nitro-L-arginine methyl ester in anesthetized dogs. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **29(1)**:33-39, 1996.
- ZAYER, M.; CLEVELAND, D.; MORIN, F.C.III. Treatment of persistent pulmonary hypertension in the newborn lamb by inhaled nitric oxide. **J. Pediatric.**, **122**: 743-750, 1993.