

CRISTIANE FONSECA FREITAS

**EFEITOS DO BAY 41-2272 NA HIPERTENSÃO
PULMONAR EXPERIMENTAL EM CÃES
ANESTESIADOS**

CAMPINAS

2007

CRISTIANE FONSECA FREITAS

**EFEITOS DO BAY 41-2272 NA HIPERTENSÃO
PULMONAR EXPERIMENTAL EM CÃES
ANESTESIADOS**

**Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
para obtenção do título de Doutor em
Farmacologia**

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTUNES

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F884e Freitas, Cristiane Fonseca
Efeitos do Bay 41-2272 na hipertensão pulmonar experimental em
cães anestesiados / Cristiane Fonseca Freitas. Campinas, SP : [s.n.],
2007.

Orientador : Edson Antunes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Heparina. 2. Protaminas. 3. Hipertensão pulmonar. I.
Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Effect of Bay 41-2272 in the pulmonary hypertension
experimental in anesthetized dogs**

Keywords: • Heparin
• Protamine
• Pulmonary hypertension

Titulação: Doutorado em Farmacologia

Banca examinadora: Prof Dr Edson Antunes

Profa. Dra. Angelina Zanescio
Prof Dr Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins
Prof Dr Cleber Evandro Teixeira
Prof Dr Wilson Nadruz Junior

Data da defesa: 23-02-2007

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Profa. Dra. Angelina Zanesco

Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins

Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira

Prof. Dr. Wilson Nadruz Junior

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

Data: 23/02/07

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein

A Deus

Agradeço profundamente a Deus por sua permanente e incansável proteção, por todos os benefícios que tem me concedido dia após dia em minha vida! Não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada na busca do conhecimento. Obrigado Senhor!

Ao Cléber, esposo e companheiro que, com carinho, dedicação e compreensão, ajudou na realização deste trabalho.

Ao meu filho querido Clebinho, razão de meus esforços e conquistas, que sempre me presenteia com alegria, beijinhos e carinhos.

Aos meus pais Toninho e Suzana, pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos irmãos (as), cunhado (as), sobrinhos (as) e sogro (a): Fabiana, Simone, Jersé, Marco, Marlene, Nananda, Silvana, Leandro, Lili, Dedéia, Cacá, Flavinho, Ricardo, Neise, Dudu, Júlia, Cleila, Clayton, Alessandra, Rafael, Letícia, Carlos e Nazareth pelo apoio e incentivos. Paulo Henrique in memoriam.

*A vocês **Dedico** este trabalho*

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pelo seu empenho na orientação dispensada a mim durante a realização deste trabalho, pela oportunidade, carinho, confiança e, acima de tudo, pela paciência nestes oitos anos de amizade e trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci, pela ajuda financeira e técnica.

À Profa. Dra Dessanka Dragosava, pelo apoio constante, presteza em ensinar sempre que solicitada e por todos os favores prestados. O meu respeito e o meu sincero agradecimento.

À Profa. Dra Ilka Boim, pela sua constante amizade, idéias sugeridas e favores prestados. O meu muito obrigado.

À Profa. Dra Joyce Annichino-Bizzacchi, pelos favores prestados.

Aos Professores e colaboradores do Departamento de Farmacologia FCM (UNICAMP): Angelina Zanesco, Cleber E. Teixeira, Elen C. T. Landucci, Ivani A. de Souza, Stephen Hyslop, Heitor Moreno e Sisi Marcondes, pela amizade, carinho, atenção, discussões e disponibilidade em colaborar sempre.

Aos amigos Enilton e Zaine, pela amizade, ajuda e o carinho constante que me proporcionaram durante estes anos.

Aos técnicos Aguinaldo e Silmara (Unicamp), e Claudiney (PUC Minas), pela ajuda e o convívio agradável na realização dos experimentos.

Aos amigos e companheiros do departamento: Andréia, Adriana, Alice Carla, Cristina, Fábio, Fabíola, Fernanda, Fernanda e Marcelo, Fernando, Heloisa, Juliana, Letícia, Luciana, Lineu, Mário, Nádia, Priscila, Rafael, Rafael Prada, Sara, Tatiane, Tomaz pela amizade, companheirismo, ajuda e agradável ambiente de trabalho proporcionado.

Aos funcionários deste Departamento pelo carinho com que sempre me trataram.

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas Universidade Estadual de Campinas, pelo empenho na formação de seus alunos.

A PUC Minas, pelo seu inestimável apoio, através do programa de PPCD.

Aos amigos Henrique, Tatiana, Ana Luísa, João Ronaldo, Ana Cláudia, Maria Eliane, Maria Helena, Zezé Scassiotti, Zé Roberto e Cobra pela amizade, constante ajuda e apoio em todos os momentos deste trabalho, pelas palavras animadoras e pelos bons momentos que desfrutamos juntos.

Aos funcionários da PUC – Minas pelo carinho e atenção com que sempre me trataram.

Ao Prof. Dr. José Tasca pela presteza e dedicação em fornecer conhecimento científico.

Aos amigos da PUC Minas de Poços: Clodoaldo, Cristiane Silveira, Cleuza, Luciano, Jorge, Raquel, Flávio, Geny, Rafael, Moacir, Fernanda, Marcelo Ismar, Domingos, Lillian, Flávio, Antonelli, Kênia, Sônia, Marco, Ingrid, Tiago Patelli, pela atenção, palavras 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. Atribuo esta falha ao esforço e à ansiedade inerentes a este momento.

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxxi
LISTA DE QUADROS	xxxv
LISTA DE TABELAS	xxxvii
REAGENTES E PROCEDÊNCIA	xxxix
RESUMO	xli
ABSTRACT	xlvi
1. INTRODUÇÃO	49
1.1 Considerações gerais	51
1.2 Hipertensão pulmonar	51
1.3 Síndrome do desconforto respiratório em adultos	55
1.4 Doença pulmonar obstrutiva crônica	56
1.5 A hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina - protamina.....	57
1.6 A hipertensão pulmonar induzida por hipóxia	60
1.7 Intervenções terapêuticas	61
1.7.1 Antagonistas do receptor de endotelina-1	63
1.7.2 Óxido nítrico inalatório	64
1.7.3 Prostaciclina	65
1.7.4 Bloqueadores de canais de cálcio	67
1.7.5 Inibidores da fosfodiesterase-5	67

1.8	Moléculas experimentais	69
1.8.1	Mecanismo de vasodilatação mediado pela guanilil ciclase solúvel	69
1.8.2	YC-1	70
1.8.3	BAY 41-2272	71
1.9	Objetivos	74
1.9.1	Objetivos gerais	74
1.9.2	Objetivos específicos	74
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	75
2.1	Animais	77
2.2	Procedimento experimental	77
2.3	Obtenção dos parâmetros hemodinâmicos	80
2.4	Protocolos experimentais	81
2.4.1	Indução de hipertensão pulmonar pela reversão do efeito anticoagulante da heparina pela protamina	81
2.4.2	Indução de hipertensão pulmonar por hipóxia	82
2.4.3	Determinação da concentração plasmática de GMPc	82
2.4.4	Determinação da concentração plasmática do tempo de tromboplastina parcial ativado	83
2.5	Análise estatística	84
3.	RESULTADOS	85
3.1	Alterações hemodinâmicas induzidas pelo complexo heparina-protamina	87
3.2	Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações hemodinâmicas decorrentes do complexo heparina-protamina.....	91

3.2.1	Saturação de oxigênio na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina	95
3.2.2	Níveis Plasmáticos de GMPC	96
3.2.3	Tempo de tromboplastina parcial ativado	97
3.3	Hipertensão pulmonar induzida por hipóxia	98
3.4	Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações hemodinâmicas decorrentes da hipóxia	99
3.4.1	Saturação de oxigênio na hipertensão pulmonar induzida por hipóxia	104
3.4.2	Níveis Plasmáticos de GMPC	105
4	DISCUSSÃO	107
5	CONCLUSÃO	117
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
7	ANEXOS	141
	ANEXO 1	143
	ANEXO 2	145

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análise de variância
ASC	área de superfície corporal
ATP	trifosfato de adenosina
ATPase	enzima ATPase
BAY 41-2272	(5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1 <i>H</i> -pirazol[3, 4- <i>b</i>]piridin-3-il]- pirimidin-4-ilamina)
BAY 41-8543	(2-[1-[(2-fluorfenil)metil]-1 <i>H</i> -pirazolo[3,4- <i>b</i>]piridin-3-yl]-5(4- morfolinil)-4,6-pirimidinadiazina)
BAY 58-2667	ácido 4-[[[(4-carboxibutil){2-[(4-fenetilbenzil)oxi]fenetil} amino] metil [benzóico]
Bpm	batimentos por minuto
Ca ²⁺	cálcio
CHP	complexo heparina-protamina
CO ₂	dióxido de carbono
C-terminal	grupamento carboxi-terminal
Cys ²³⁸	resíduo de cisteína ²³⁸ na cadeia polipeptídica
Cys ²⁴³	resíduo de cisteína ²⁴³ na cadeia polipeptídica
DC	débito cardíaco
DMSO	dimetil sulfóxido
DPOC	doença pulmonar obstrutiva crônica
E.P.M.	erro padrão das médias
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
Fe ²⁺	íon ferroso
Fe ³⁺	íon férrico
FiO ₂	fração inspiratória de oxigênio
GCs	guanilil ciclase solúvel
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
GTP	trifosfato de guanosina
Hep	heparina
Hip	hipóxia
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IC	índice cardíaco
IRVP	índice de resistência vascular pulmonar
IRVS	índice de resistência vascular sistêmica
K ⁺	potássio
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
mmHg	milímetros de mercúrio
NO	óxido nítrico
Norm	normóxia
NOS	óxido nítrico sintase
N-terminal	grupamento amino terminal
OMS	Organização Mundial de Saúde

PAD	pressão de átrio direito
PAM	pressão arterial média
PcP	pressão capilar pulmonar
PDE-5	fosfodiesterase-5
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGI ₂	prostaciclina
PMAP	pressão média da artéria pulmonar
PNA	peptídeo natriurético atrial
pp ET-1	pre-proendotelina
ppm	parte por milhão
PPP	plasma pobre em plaquetas
pro ET-1	proendotelina
Prot	protamina
rpm	rotações por minuto
RVP	resistência vascular pulmonar
RVS	resistência vascular sistêmica
SDRA	síndrome do desconforto respiratório do adulto
SpO ₂	saturação de oxigênio
SRD	sem raça definida
TTPA	tempo de tromboplastina parcial ativado
YC-1	3-(5'-hidroximetil-2'fúril)-1-benzil indazol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Vias importantes na terapêutica da hipertensão pulmonar.....	62
Figura 2 Estrutura da guanilil ciclase solúvel e sua ativação pelo NO	69
Figura 3 Estrutura química do YC-1 e seu análogo BAY 41-2272	71
Figura 4 Representação esquemática do catéter de Swan-Ganz.....	78
Figura 5 Representação esquemática do catéter de Swan-Ganz locado na artéria pulmonar	78
Figura 6 Determinação do débito cardíaco pela técnica de termodiluição.....	79
Figura 7 Alterações hemodinâmicas induzidas pelo complexo heparina- protamina. A) PMAP; B) IRVP; C) MPA; D) IRVS; E) FC; F) IC ...	89
Figura 8 Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão média da artéria pulmonar (PMAP; painel A) e do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP; painel B) decorrentes do complexo heparina-protamina	92
Figura 9 Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; painel A) e índice resistência vascular sistêmica (IRVS; painel B) decorrentes do complexo heparina-protamina	93
Figura 10 Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da frequência cardíaca (FC; painel A) e índice cardíaco (IC; painel B) decorrentes do complexo heparina-protamina.....	94
Figura 11 Efeitos do BAY 41-2272 sobre os níveis plasmáticos de GMPc em cães controles e tratados com BAY 41-2272.....	96
Figura 12 Alterações da pressão média da artéria pulmonar (PMAP).....	98

Figura 13 Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão média da artéria pulmonar (PMAP; painel A) e do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP; painel B) decorrentes de hipóxia.....	100
Figura 14 Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; painel A) e índice de resistência vascular sistêmica (IRVS; painel B) decorrentes de hipóxia	101
Figura 15 Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da frequência cardíaca (FC; painel A) e índice cardíaco (IC; painel B) decorrentes de Hipóxia	102
Figura 16 Efeitos do BAY 41-2272 sobre os níveis plasmáticos de GMPc em cães submetidos à hipóxia e tratados com BAY 41-2272	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Classificação da hipertensão pulmonar de acordo com os Anais do 3º Simpósio Mundial em Hipertensão Arterial Pulmonar, Veneza, 2003	54
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos do BAY 41-2272 sobre a pressão capilar pulmonar nos cães submetidos ao complexo heparina-protamina	90
Tabela 2	Efeitos do BAY 41-2272 sobre a saturação de oxigênio (SpO ₂) nos cães submetidos ao complexo heparina-protamina	95
Tabela 3	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) <i>in vitro</i>	97
Tabela 4	Efeitos do BAY 41-2272 sobre a pressão capilar pulmonar nos cães submetidos à hipóxia	103
Tabela 5	Efeitos do BAY 41-2272 sobre a saturação de oxigênio (SpO ₂) nos cães submetidos à hipóxia	104

REAGENTES E PROCEDÊNCIA

BAY 41-2272.....	Pharma Research Center, Bayer AG (Wuppertal, Alemanha)
Citrato de Fentanila.....	Cristália Pr. Quím. e Farm. (Itapira, SP, Brasil)
Diazepam.....	Cristália Pr. Quím. e Farm. (Itapira, SP, Brasil)
DMSO	Nuclear (Diadema, SP, Brasil)
Gás de hipóxia (12% O ₂ , 5% CO ₂ , N ₂)	Withe Martins (Varginha, MG, Brasil)
Heparina Sódica.....	Roche (São Paulo, SP, Brasil)
IBMX (3-isobutil-1-metilxantina).....	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA)
Pentobarbital Sódico (Hypnol [®]).....	Cristália Pr. Quím. e Farm. (Itapira, SP, Brasil)
Sulfato de Protamina.....	Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA)

RESUMO

Neste estudo, investigamos os efeitos protetores do BAY 41-2272 sobre a hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina e hipóxia em cães anestesiados. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol, 30mg/kg, iv) combinado com citrato de fentanila (0,01 mg/kg/h, i.v.) e diazepam (0,25 mg/kg/h, iv). A hipertensão pulmonar pelo complexo heparina-protamina foi induzida com a administração de 500 UI/kg de heparina, seguida da administração de protamina (10 mg/kg). A interação heparina-protamina causou aumento de aproximadamente 350% da pressão média da artéria pulmonar (PMAP), acompanhado de aumento significativo do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP) e da pressão capilar pulmonar (PcP). Este aumento foi significativo 2 min após a injeção de protamina, mantendo-se significativamente elevado até aproximadamente 5 minutos após administração da mesma. Ao mesmo tempo em que se detectou a hipertensão pulmonar, observamos redução significativa da pressão arterial média (PAM). Observamos ainda um aumento significativo da frequência cardíaca (FC) aos 2 minutos após administração da protamina com discreta diminuição do índice cardíaco (IC). O índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) não sofreu alterações significativas. A saturação do oxigênio (SpO₂) foi significativamente diminuída após a formação do complexo heparina-protamina. Nos animais tratados com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min, i.v.), observamos redução marcante do aumento da PMAP, do IRVP e da PcP. Por outro lado, este tratamento potencializou a redução da PAM. Além disso, o BAY 41-2272 reduziu significativamente o IRVS e aumentou a FC. A diminuição da SpO₂ foi atenuada significativamente pelo BAY 41-2272. Os níveis plasmáticos de GMPc foram dosados aos 2 min após a formação do complexo heparina-protamina, tendo-se mostrado elevados no grupo tratado com o BAY 41-2272. O tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) não apresentou alteração significativa no tratamento com o BAY 41-2272. O veículo do BAY 41-2272 (DMSO 30%) não alterou significativamente os parâmetros estudados.

A hipertensão pulmonar por hipóxia foi induzida com a instalação de uma baixa tensão de oxigênio (FiO₂=12%). Nesta circunstância, a PMAP elevou-se em aproximadamente 280% aos 5 minutos, mantendo-se significativamente elevada até 15 minutos após instalação da hipóxia. A elevação da PMAP foi acompanhada de aumentos significativos no IRVP e PcP. A PAM, IRVS, FC e IC não apresentaram alterações significativas. A SpO₂ diminuiu na presença da hipóxia. O tratamento com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min, i.v.), reduziu significativamente a PMAP, PcP e IRVP. O IRVS foi significativamente potencializado pelo BAY 41-2272. A PAM, FC e IC não alteraram significativamente. A diminuição da SpO₂ foi atenuada significativamente pelo BAY 41-2272. Os níveis plasmáticos de GMPc elevaram-se significativamente no grupo tratado com o BAY 41-2272. Em conclusão, o BAY 41-2272 atenuou a ação vasoconstritora pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina e hipóxia levando a uma prevenção da hipertensão pulmonar.

ABSTRACT

In this study, we investigated the protective effect of BAY 41-2272 on the pulmonary hypertension induced by the protamine-heparin complex and hypoxia in anaesthetized dogs. The animals were anaesthetized with pentobarbital sodium (Hypnol, 30 mg/kg, i.v.) combined with fentanyl citrate (0.01 mg/kg/h, i.v.) and diazepam (0.25 mg/kg/h, i.v.). The pulmonary hypertension for the protamine-heparin complex was induced by the administration of 500 UI/kg of heparin, followed by protamine (10 mg/Kg), causing an increase of approximately 350% of the mean pulmonary arterial pressure (MPAP), followed by a significant increase of the index of pulmonary vascular resistance (IPVR) and index of pulmonary capillary wedge pressure (PcWP). This increase was significant from 2 min to 5 min after the protamine administration. Concomitantly to the pulmonary hypertension, we observed a significant decrease of the mean arterial blood pressure (MABP). We also observed a significant increase of the heart rate (HR) 2 min after administration of protamine with a discreet reduction of the cardiac index (IC). The index of systemic vascular resistance (ISVR) was not changed. The saturation of the oxygen (SpO₂) was significantly decreased after the formation of heparin-protamine complex. In the animals treated with BAY 41-2272 (10 µg/kg/min, i.v.), we observed a marked reduction of MPAP, IPVR and PcWP. On the other hand, BAY 41-2272 potentiated the reduction of MABP after protamine administration. Furthermore, BAY 41-2272 significantly reduced the ISVR and increased HR. Additionally, the reduction of SpO₂ was attenuated significantly by BAY 41-2272. The plasma levels of cGMP, measured at 2 min after the formation of the protamine-heparin complex, were higher in BAY 41-2272-treated animals. The activated partial thromboplastin time (APTT) was not altered in the BAY 41-2272-treated group. The vehicle of BAY 41-2272 (DMSO 30%) did not alter any of the parameters evaluated.

The hypoxia-induced pulmonary hypertension was obtained with the installation of low tension of oxygen (FiO₂=12%). In this condition, MPAP was significantly elevated (280%) from 5 min to 15 min after hypoxia installation. This elevation was accompanied by significant increases in both IPVR and PcWP. The MABP, ISVR, HR and IC were not significantly altered. The SpO₂ was decreased by hypoxia. The treatment with BAY 41-2272 (10 µg/kg/min, i.v.) reduced significantly the MPAP, PcWP and IPVR. The ISVR reduction was significantly potentiated by BAY 41-2272. The MABP, HR and IC were not modified by BAY 41-2272, while the reduction of the SpO₂ was significantly attenuated. The plasma levels of cGMP were significantly increased in the BAY 41-2272-treated group.

In conclusion, treatment with BAY 41-2272 attenuates the pulmonary vasoconstrictor action induced by heparin-protamine complex or hypoxia, leading to the prevention of pulmonary hypertension

INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A hipertensão pulmonar é uma seqüela comum resultante de diversas doenças respiratórias e cardiovasculares nos seres humanos. É caracterizada pela elevação da resistência vascular pulmonar e da pressão arterial pulmonar devido à vasoconstrição exagerada do leito arterial pulmonar (Jeffery & Wanstall, 2001). Embora a natureza da hipertensão pulmonar quanto à fisiopatologia e tratamento tenha sido negligenciada no passado, nos últimos anos adquiriu-se grande conhecimento da sua etiologia e tratamento. Em 2003, ocorreu em Veneza o 3º Simpósio Mundial em Hipertensão Arterial Pulmonar, onde houve uma nova classificação e revisão de conceitos terapêuticos desta condição. Entretanto, a hipertensão pulmonar é uma síndrome complexa para a qual ainda não existem esquemas simples de avaliação diagnóstica e orientação terapêutica.

1.2 Hipertensão pulmonar

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

Na vigência de hipertensão pulmonar, a resistência vascular pulmonar eleva-se marcadamente, e a pressão sistólica pulmonar e a pressão arterial pulmonar média atingem valores acima de 30 e 25 mmHg, respectivamente, em estado de repouso, ou de 30 a 35

mmHg durante exercícios físicos. Isto pode levar à falência do coração direito e morte (Rich, *et al.*, 1987).

A hipertensão pulmonar era classificada, segundo a etiologia, em primária e secundária. A hipertensão pulmonar primária era definida pela presença de elevação persistente da pressão na artéria pulmonar, sem causa aparente (arteriopatia, venopatia, microangiopatia), ao passo que a hipertensão pulmonar secundária era consequência de doenças associadas (Zapol & Snider, 1977; Pietra 1997; Maclean, 1998; Hay, 1998).

No 3º Simpósio Mundial em Hipertensão Arterial Pulmonar em 2003, decidiu-se por uma nova classificação e revisão de conceitos fisiopatológicos, diagnósticos e terapêuticos da hipertensão pulmonar (Rubin & Galiè, 2004; Lee & Rubin, 2005), conforme mostrado no quadro 1. Atualmente, a hipertensão pulmonar primária passa a ser chamada hipertensão arterial pulmonar, pertencente ao Grupo 1, onde se enquadram a hipertensão pulmonar idiopática (esporádica ou familiar), dentre outras (Quadro 1). A hipertensão pulmonar secundária agora pertence aos grupos de 2 a 5, onde estão incluídos a hipertensão pulmonar decorrente de doenças cardíacas (grupo 2), doenças pulmonares (grupo 3), doenças trombolíticas (grupo 4) e diversas outras condições que levam à hipertensão pulmonar (grupo 5).

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), as causas que levam aos diferentes tipos de hipertensão pulmonar são: a hipertensão arterial pulmonar, a hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido, drogas, síndrome do desconforto respiratório do adulto (SDRA), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística e estados hipoxêmicos em geral (Zapol & Snider, 1977; Maclean, 1998; Hay, 1998, Jeffery & Wanstall, 2001). A causa mais comum que desencadeia a hipertensão pulmonar por hipóxia é a exposição a altitudes elevadas e estados de hipoxemia, a qual pode ser

acompanhada por policitemia e remodelação das paredes das artérias pulmonares (Fagan, 1999). A hipertensão pulmonar é ainda observada clínica e experimentalmente na reversão do efeito anticoagulante da heparina pela protamina (Lowenstein, 1989).

CLASSIFICAÇÃO DA HIPERTENSÃO PULMONAR

1. Hipertensão Arterial Pulmonar

- 1.1. Idiopática;
- 1.2. Familiar;
- 1.3. Relacionada à doença do tecido conjuntivo, cardiopatias congênitas, Hipertensão porto pulmonar, infecção por HIV, drogas, toxinas e outras;
- 1.4. Hipertensão arterial pulmonar com envolvimento venoso e/ou capilar;
- 1.5. Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido.

2. Hipertensão Pulmonar por doença do coração esquerdo

- 2.1. Doença cardíaca atrial ou ventricular esquerda;
- 2.2. Valvulopatia.

3. Hipertensão Pulmonar por doença pulmonar e/ou hipóxia

- 3.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica;
- 3.2. Doença pulmonar intersticial;
- 3.3. Distúrbios durante o sono, hipoventilação alveolar, exposição crônica a grandes altitudes;
- 3.4. Anormalidades do desenvolvimento.

4. Hipertensão Pulmonar por doença tromboótica e/ou embólica crônica

- 4.1. Obstrução tromboembólica das artérias pulmonares proximais;
- 4.2. Obstrução tromboembólica das artérias pulmonares distais;
- 4.3. Embolia pulmonar de origem tumoral, parasitas, corpo estranho.

5. Outros

- 5.1. Sarcoidose, histiocitose, linfangiomatose, compressão de vasos pulmonares (adenopatias, tumores, mediastinite fibrosante).

Quadro 1 – Classificação da hipertensão pulmonar de acordo com os Anais do 3º Simpósio Mundial em Hipertensão Arterial Pulmonar, Veneza, 2003.

1.3 Síndrome do desconforto respiratório do adulto

A hipertensão pulmonar aguda está invariavelmente presente em pacientes com 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 da SDRA, é comum a ocorrência de oclusão tromboembólica da vasculatura pulmonar, podendo ainda levar à 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 as complicações iatrogênicas do tratamento intensivo (toxicidade por oxigênio e barotrauma). Acredita-se também que a produção de óxido nítrico (NO) está 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).

1.4 Doença pulmonar obstrutiva crônica

Na DPOC, o quadro clínico é resultante da combinação de dois processos patológicos, a saber: bronquite crônica e enfisema, sendo os mesmos importantes no desencadeamento dessa doença.

Na DPOC devido à brônquite crônica, 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 dióxido de carbono (CO₂), pode surgir insuficiência ventricular direita. Nesse tipo de DPOC, a hipertensão pulmonar é do tipo “pré-capilar” sendo quase exclusivamente devida ao aumento da resistência vascular pulmonar que se instala principalmente em resposta à hipóxia aguda (ou crônica). O remodelamento 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 mmHg), mas a pressão arterial pulmonar pode aumentar rapidamente durante exercícios, sono e episódios de insuficiência respiratória. O aumento de pós-carga pode ainda favorecer o desenvolvimento de insuficiência do ventrículo direito (Navin & Gross, 1996; Wanstall & Jeffery, 1998).

Na 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 pulmonares normais (Navin & Gross, 1996; Wanstall & Jeffery, 1998).

A DPOC é uma das causas mais comuns de morte que vem aumentando nos últimos anos (Lopez *et al.*, 2006). Dessa forma, há grande interesse em se conhecer a fisiopatologia desta doença com o objetivo de se buscar novas terapias farmacológicas (Barnes *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2001). Tendo em vista que a DPOC é uma doença inflamatória complexa envolvendo diferentes tipos celulares, com capacidade de liberar diversos mediadores inflamatórios, acredita-se que os antagonistas de mediadores inflamatórios possam ter potencial terapêutico nesta doença (Barnes *et al.*, 2004).

1.5 A hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina

O uso clínico da protamina foi primeiramente relatado por Hagerdorn *et al.* (1936) quando estes 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 em pós-operatório de cirurgias com circulação extracorpórea (Harrow, 1985).

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

A hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina *in vivo* desenvolve-se facilmente em caprinos e suínos, 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 caprinos, bovinos e suínos, e em menor número em humanos (Warner *et al.*, 1986; Staub, 1988; Schapira & Christman, 1990). De fato, existe grande similaridade entre a pressão arterial pulmonar em caprinos que receberam o complexo heparina-protamina com aqueles em que se administrou micropartículas circulatórias capazes de ativar macrófagos pulmonares (Chang & Voelkel, 1989). O aumento da concentração plasmática de tromboxano A₂ foi também relatado em modelos de hipertensão pulmonar em suínos e caprinos (Degges *et al.*, 1987; Morel *et al.*, 1988). A hipótese do tromboxano A₂ como principal mediador da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina em caprinos foi ainda apoiada por Montalescot *et al.* (1990). Demonstrou-se

também que a hipertensão pulmonar mediada pela formação de tromboxano A₂ 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).

A utilização da protamina em vários procedimentos clínicos reverte o efeito anticoagulante da heparina, reduzindo a hemorragia (Lowenstein *et al.*, 1983). Em cirurgias cardiovasculares esta reversão pode levar a um quadro de hipertensão pulmonar e complicações como depressão do miocárdio, hipotensão sistêmica e reações alérgicas em 2,6% dos procedimentos cirúrgicos (Kimmel *et al.*, 1998a; Carr & Silverman 1999; Welsby *et al.*, 2005; Stafford-Smith *et al.*, 2005). Em cirurgias de revascularização miocárdica esta proporção chega a 39% (Kimmel *et al.*, 1998b; Welsby *et al.*, 2005). Estudos em modelos experimentais realizados em caprinos, suínos, caninos, roedores e em humanos mostraram que a utilização de drogas como aspirina (Comunale *et al.*, 2003), dazoxibeno, NO inalatório, indometacina, tezosentan (Freitas *et al.*, 2004) e prostaciclina (Ocal *et al.*, 2005), melhorou o quadro da hipertensão pulmonar; por outro lado, e em cirurgias de revascularização miocárdica, a heparinase I não mostrou-se apropriada para substituir a protamina na reversão da heparina (Stafford-Smith *et al.*, 2005).

1.6 A hipertensão pulmonar induzida por hipóxia

A hipóxia induz uma potente vasoconstrição pulmonar, conduzindo a um aumento da pressão arterial pulmonar (Ghofrani *et al.*, 2004, Lee & Rubin, 2005). A hipóxia representa um dos mecanismos fisiopatológicos mais importantes no processo de vasoconstrição pulmonar, além de ser um complicador em diversas doenças, não deixando de mencionar que é um dos modelos experimentais mais bem estudados de hipertensão pulmonar (Voelkel, 1986; Stenmark *et al.*, 1987; Weir & Archer, 1995). A obstrução de vias aéreas é caracterizada pela redução no volume expiratório, acarretando vasoconstrição e elevação adicional da resistência arteriolar pulmonar. A obstrução decorrente de doenças pulmonares crônicas leva à hipoxemia, que é um fator etiológico conhecido na hipertensão pulmonar associada a doenças cardíacas, pulmonares, trombolíticas, dentre outras (Salvaterra & Rubin, 1993).

Estudos em roedores mostram que a hipertensão pulmonar induzida por hipóxia é mediada por receptores ET_A de ET-1 os quais estão aumentados após exposição à hipóxia; estes poderiam exercer um papel importante no remodelamento vascular 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 contrabalanceando o desenvolvimento da hipertensão pulmonar (Muramatsu *et al.*, 1999, Soma *et al.*, 1999). Estudos recentes sugerem a participação do peptídeo natriurético atrial (PNA) na regulação da pressão arterial pulmonar e no remodelamento vascular pulmonar em resposta ao stress por hipóxia (Chen *et al.*, 2006). Estudos em cães expostos a diferentes níveis de altitude mostraram que

altitudes elevadas resultam na diminuição da oferta de oxigênio, levando a um quadro de hipóxia e conseqüentemente à hipertensão pulmonar (Glaus *et al.*, 2003).

Evidências experimentais sugerem que curtos períodos de hipóxia na fase fetal podem resultar em alterações estruturais vasculares pulmonares, aumento da espessura da parede das arteríolas pulmonares bem como da musculatura dos vasos periféricos em decorrência do *shunts* atrial e ductal, levando à redução do fluxo pulmonar, acentuando a hipoxemia (Dick *et al.*, 1981). Por outro lado, distúrbios pós-natais como hemorragia, hipoglicemia, aspiração, hipóxia, podem resultar em deficiência da dilatação de vasos pulmonares, bem como em disfunção ventricular esquerda, contribuindo para o quadro de hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (Rabinovitch, 2001).

1.7 Intervenções terapêuticas

O tratamento eficaz da hipertensão pulmonar depende de um diagnóstico correto e definitivo, sendo o cateterismo indicado para determinar o diagnóstico e prognóstico desta patologia (Barst *et al.*, 2004; McGoon *et al.*, 2004). A sobrevida média dos pacientes com hipertensão pulmonar é de aproximadamente 2,8 a 5 anos (D'Alonso *et al.*, 1991).

Alguns medicamentos têm se mostrado eficazes no tratamento da hipertensão pulmonar, como a prostaciclina, antagonistas do receptor da endotelina-1 (ET-1), inibidores da fosfodiesterase-5 (PDE-5), NO inalatório, drogas doadoras de NO, bloqueadores de canais de cálcio, diuréticos de alça, glicosídeos cardíacos e anticoagulantes. A suplementação com oxigênio também é utilizada, produzindo melhora do quadro clínico (Rich *et al.*, 1992; Frank *et al.*, 1997; Rick *et al.*, 1998; Roberts *et al.*, 2001; Lee & Rubin,

2005). O desenho de novas drogas tem se centrado nas principais vias de sinalização cujas alterações podem resultar em hipertensão pulmonar; estes são representados pela ET-1, NO e metabolismo do ácido araquidônico, destacados na figura 1.

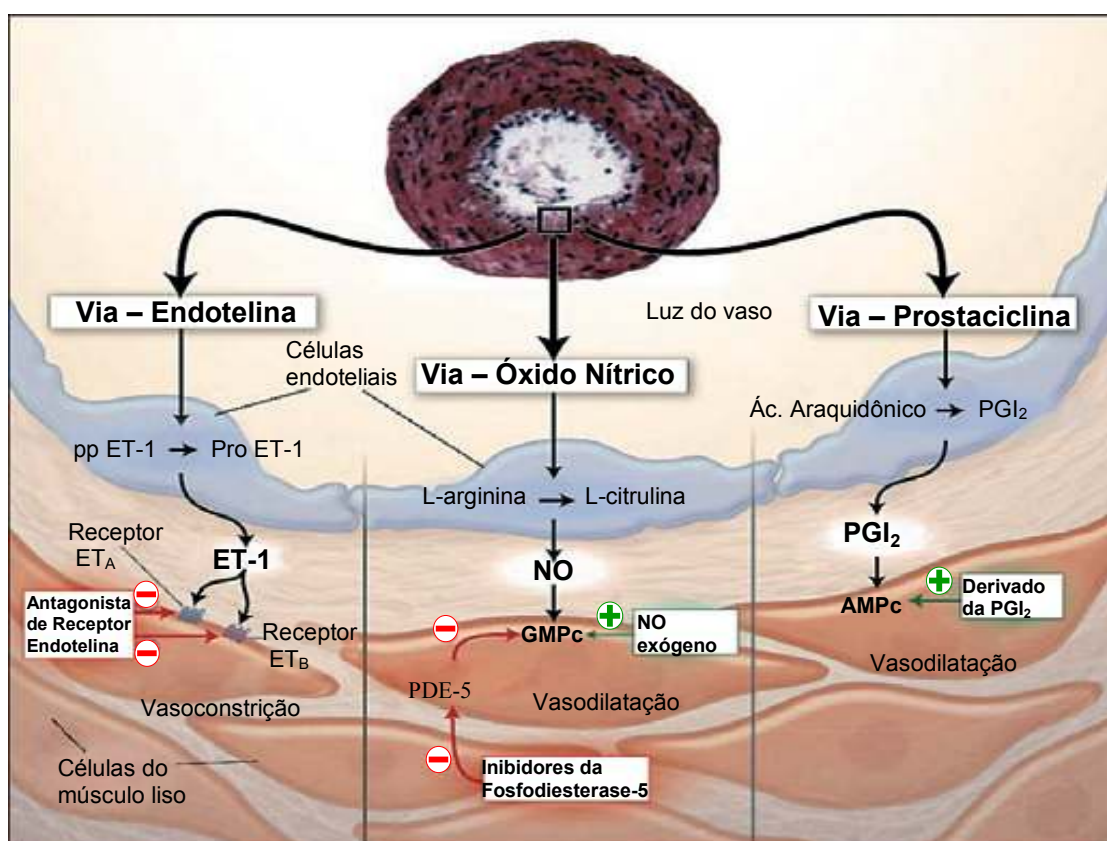


Figura 1 Vias importantes na terapêutica da hipertensão pulmonar. Os sinais positivos denotam um aumento na concentração intracelular; sinais negativos, bloqueio de um receptor, inibição de enzima, ou diminuição da concentração intracelular (Lee & Rubin, 2005).

1.7.1 Antagonistas do receptor de endotelina-1

A endotelina-1 (ET-1) é um potente peptídeo vasoconstritor (Yanagisawa *et al.*, 1988), que atua principalmente em dois tipos de receptores, ET_A e ET_B, os quais estão distribuídos nos vários tecidos do organismo (Arai *et al.*, 1990; Takai *et al.*, 1992). A ET-1 é formada a partir da preproendotelina (ppET-1), que é clivada por uma endopeptidase originando a pró-endotelina. A ET-1 origina-se de uma clivagem proteolítica da pró-endotelina pela enzima conversora de endotelina (ECE) (Yanagisawa *et al.*, 1988).

O efeito vasoconstritor da ET-1 é mediado por ativação de canais de cálcio e ativação de fosfolipase C, os receptores são acoplados à proteína G (Murali, 2006; Rich, 2006). O efeito vasodilatador deste peptídeo parece ser devido à liberação de prostanóides, principalmente prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂), por ação da fosfolipase A₂, e liberação do NO pelas células endoteliais (Rich, 2006). A atividade vasoconstritora da ET-1 é mediada pela ativação tanto dos receptores ET_A como do ET_B. Assim, acredita-se que os efeitos vasoconstritores da ET-1 sejam modulados pela liberação concomitante de NO, PGI₂ e PGE₂ que reduziriam a amplitude e a duração das respostas vasoconstritoras, tanto *in vivo* como *in vitro* (De Nucci *et al.*, 1988; Rae *et al.*, 1989; Warner *et al.*, 1989a; Withrington *et al.*, 1989; Grassi-Kassisse *et al.*, 1995; Faro *et al.*, 1995). O efeito vasodilatador é mediado pela ativação de receptores ET_B.

Em pulmões, a ET-1 é expressa abundantemente, sugerindo que a mesma possa ter um importante papel na regulação do *tonus* vascular pulmonar e no remodelamento vascular pulmonar, processos importantes na patogenia da hipertensão pulmonar (Hemsém, 1991; Marciniak *et al.*, 1992; Lee & Rubin, 2005). Níveis plasmáticos elevados de endotelina em pacientes adultos e crianças com hipertensão pulmonar têm sido relatados

em vários estudos, sendo os mesmos, muitas vezes, correlacionados com a severidade e prognóstico da doença (Stewart *et al.*, 1991; Cody *et al.*, 1992; Goldie *et al.*, 1996; Franco-Cereceda *et al.*, 1999).

Em estudos experimentais, antagonistas seletivos e não seletivos de ET-1, atenuaram a hipertensão pulmonar induzida por *bypass* cardiopulmonar, hipóxia, monocrotalina e pelo complexo heparina-protamina (Chen *et al.*, 1995; Bialecki *et al.*, 1998; Holm *et al.*, 1998; Carteaux *et al.*, 1999; Underwood *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2004). Estes antagonistas também foram capazes de reduzir a hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (Ivy *et al.*, 1997). Mais recentemente, o bosentan (antagonista não seletivo da ET-1), administrado por via oral, mostrou-se eficaz no tratamento da hipertensão pulmonar em humanos; porém, causou acúmulo de transaminases anormais associadas a lesões hepáticas, bem como cefaléia e diminuição na concentração da hemoglobina (Humbert *et al.*, 2005; Lee & Rubin, 2005).

1.7.2 Óxido nítrico inalatório

No pulmão normal, o endotélio vascular das vias aéreas produz o NO que por sua vez regula a perfusão vascular e a ventilação alveolar. Entretanto, na hipertensão pulmonar, a produção de NO é prejudicada, provavelmente porque vasoconstritores, tais como o tromboxano A₂ e a ET-1, são liberados em excesso, mascarando o efeito do NO (Farber & Loscalzo, 2004; Machado *et al.*, 2004; Evgenov *et al.*, 2006). Dessa forma, o uso de NO inalatório pode ter grande valor terapêutico. O NO inalatório reduziu a hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina em ratos neonatos (Roberts *et al.*, 2000) e pelo complexo heparina-protamina em cães anestesiados (Freitas *et al.*, 2004). Em humanos

(adultos e crianças) com doenças pulmonares crônicas ou cardíacas, decorrentes de troca de valva mitral, hipertensão pulmonar idiopática e doença pulmonar obstrutiva crônica, o NO inalatório reduziu a resistência vascular pulmonar, sem afetar a resistência vascular sistêmica (Doyle, 1981; Pepke-Zaba *et al.*, 1991; Adatia *et al.*, 1993; Fratacci *et al.*, 1992). O NO inalado parece também melhorar a hipertensão pulmonar persistente do recém nascido, podendo ser eficaz em pacientes prematuros com SDRA, doenças pulmonares e cardiopatias com repercussão pulmonar (Weinberger *et al.*, 2001).

As limitações de NO inalado como terapia crônica para o tratamento da hipertensão pulmonar incluem a duração curta da vasodilatação pulmonar, possível formação de dióxido de nitrogênio (potente irritante pulmonar) e de peroxinitrito (um oxidante citotóxico). Incluem ainda a inativação rápida na circulação pela hemoglobina, a produção de metahemoglobinemia e, possivelmente, a indução de vasodilatação extra-pulmonar, sem contar que nem todos os pacientes com hipertensão pulmonar respondem ao NO inalado (Weinberger *et al.*, 2001; Ichinose *et al.*, 2004; Evgenov *et al.*, 2006).

1.7.3 Prostaciclina

O tratamento de pacientes hipertensos pulmonares com prostaciclina melhorou a capacidade física, a hemodinâmica e a sobrevida dos pacientes (Rubin *et al.*, 1990; Barts *et al.*, 1996; Barst, 1998; Sanchez *et al.*, 1999; Badesch *et al.*, 2000). Por outro lado, a prostaciclina apresentou desvantagens, como o tempo de meia-vida curto, a necessidade de se fazer infusão contínua e custo elevado (Jeffery & Wanstall, 2001). Outras formulações de prostaciclina para tratamento da hipertensão pulmonar incluem o epoprostenol, treprostínil, iloprost inalatório e beraprost.

O epoprostenol é um potente vasodilatador de ação rápida. Tem se mostrado benéfico no tratamento da hipertensão pulmonar idiopática e na hipertensão pulmonar associada à escleroderma, ao lupus eritematoso sistêmico, à infecção por HIV, na hipertensão portopulmonar e síndrome de Eisenmenger (McLaughlin *et al.*, 2002; Lee & Rubin, 2005). Este medicamento requer uma bomba portátil de infusão para a administração contínua endovenosa, devida à curta meia-vida (<5 min) e do pH elevado do diluente. Além disso, possui estabilidade química apenas em baixas temperaturas (Lee & Rubin, 2005).

O treprostinil é um análogo estável da prostaciclina com meia-vida de 55-117 minutos, podendo ser administrado subcutaneamente à temperatura ambiente (Olschewski *et al.*, 2004; Lee & Rubin, 2005). Estudos mostraram melhora na hipertensão pulmonar idiopática ou associada à doença do tecido conjuntivo, no *shunt* pulmonar congênito sistêmico, nos parâmetros hemodinâmicos e na dispnéia (Barst *et al.*, 1996; Sitbon *et al.*, 2002; Lee & Rubin, 2005).

O iloprost inalatório é estável à temperatura ambiente e tem meia-vida de aproximadamente 30 minutos (Krause & Krais, 1986, Grant & Goa, 1992; Olschewski *et al.*, 2003). Este fármaco produz vasodilatação seletiva na circulação pulmonar, minimizando os efeitos sistêmicos associados aos prostanóides endovenosos. Entretanto, requer administração de 6 a 9 vezes ao dia, entre 5 e 10 minutos usando-se um nebulizador (Lee & Rubin 2005).

O beraprost, um análogo oral ativo da prostaciclina, mostrou-se eficaz nos sintomas da hipertensão pulmonar; porém, atualmente o beraprost é aprovado para o uso somente no Japão (Galie *et al.*, 2002; Badesch *et al.*, 2004).

1.7.4 Bloqueadores de canais de cálcio

Os bloqueadores de canais de cálcio (nifedipina, nitrendipina e amlodipina) foram capazes de reduzir a pressão arterial pulmonar em roedores e humanos (Michael *et al.*, 1986; Takahashi *et al.*, 1996; Jeffery & Wanstall, 2001). Em humanos, o tratamento da hipertensão pulmonar com bloqueadores de canais de cálcio é reservado aos pacientes com redução significativa na hemodinâmica da hipertensão pulmonar durante o teste de vasoreatividade aguda. Este teste é definido atualmente como uma redução na pressão média da artéria pulmonar ≥ 10 mmHg a um nível que seja ≤ 40 mmHg, com o débito cardíaco normal, usando vasodilatadores de ação rápida como o epoprostenol, NO inalatório, iloprost ou adenosina (Barst *et al.*, 2004; Galie *et al.*, 2004; Lee & Rubin, 2005).

1.7.5 Inibidores da fosfodiesterase-5

A inibição da fosfodiesterase-5 provoca vasodilatação pulmonar, mediada pelo aumento nos níveis de GMPc nas células s do músculo vascular pulmonar. O sildenafil, inibidor da fosfodiesterase-5, produz vasodilatação pulmonar em modelos experimentais de hipertensão pulmonar, assim como em pacientes com hipertensão pulmonar crônica (Chockalingam *et al.*, 2005; Michelakis *et al.*, 2002; Stocker *et al.*, 2003; Evgenov *et al.*, 2006). Entretanto, uma proporção significativa de pacientes com hipertensão pulmonar crônica não responde à terapia com sildenafil, indicando que nestes indivíduos a produção endógena de NO está reduzida de tal maneira que a inibição da degradação do GMPc não repercute em nenhum efeito benéfico (Chockalingam *et al.*, 2005). Os efeitos colaterais

relatados foram: cefaléia, dispepsia, congestão do sinus e dor lombar, sendo o mesmo contra-indicado em pacientes que fazem uso de medicamento à base de nitrato por potencializar os efeitos hipotensivos (Lee & Rubin 2005).

1.8 Moléculas experimentais

1.8.1 Mecanismo de vasodilatação mediado pela guanilil ciclase solúvel

A guanilil ciclase solúvel é uma enzima presente no citoplasma de quase todas as células de mamíferos, e está envolvida em várias funções fisiológicas importantes, tais como inibição da função plaquetária, relaxamento de músculo liso, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (Collier & Vallance, 1989; Hobbs, 1997).

A guanilil ciclase solúvel é um heterodímero composto de subunidades α e β , sendo que cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal (figura 2). A expressão das duas subunidades é necessária para atividade catalítica (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991).

A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da enzima pelo NO (Gerzer *et al.*, 1982; Ignarro *et al.*, 1982; Ohlstein *et al.*, 1982). O grupo heme possui ferro na forma de Fe^{2+} (forma reduzida) ou Fe^{3+} (forma oxidada) (Stone & Marletta, 1998). O

Guanilil ciclase solúvel

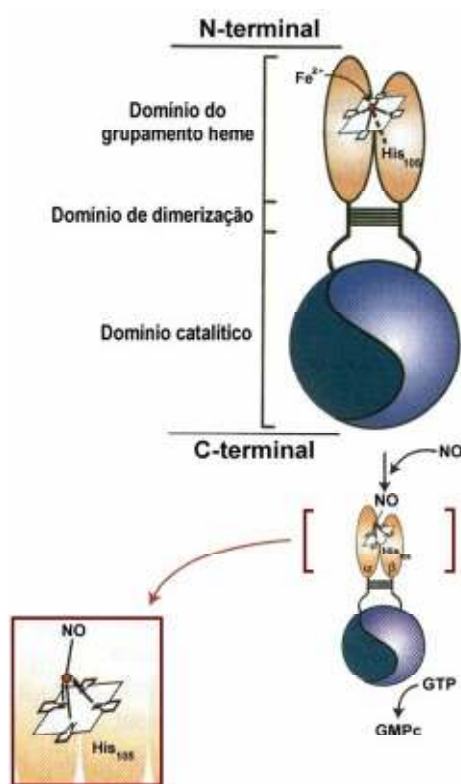


Figura 2: Estrutura da guanilil ciclase solúvel e sua ativação pelo NO. Subunidades α e β (Lucas *et al.*, 2000).

NO ativa a guanilil ciclase solúvel por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosonitrosil. A ligação do NO promove mudanças conformacionais que levam à ativação da guanilil ciclase solúvel (Traylor & Sharma, 1992; Lucas *et al.*, 2000) e, conseqüentemente, à elevação nos níveis de GMPc, formado a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (Rapoport & Murad, 1983; Lucas *et al.*, 2000). São propostos vários mecanismos para explicar a atividade relaxante resultante do aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO (Waldman & Murad, 1987; Lucas *et al.*, 2000). Estes incluem: (1) inibição da geração de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃); (2) aumento do sequestro de cálcio citossólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de cálcio; (5) ativação de proteínas quinases; (6) estimulação da cálcio-ATPase de membrana e (7) abertura de canais de K⁺. Dados experimentais sugerem que a ativação farmacológica direta da guanilil ciclase solúvel pode representar uma alternativa terapêutica promissora.

1.8.2 YC-1

O YC-1 ([3-(5'-hidroximetil-2'fúril)-1-benzil indazol] foi descrito como um ativador direto da guanilil ciclase solúvel devido à sua capacidade de se acoplar a um sítio regulatório da enzima independente do NO (Ko *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995; Stone e Marletta, 1998). Este composto se liga à guanilil ciclase solúvel em um sítio alostérico, na subunidade $\alpha 1$, a qual contém as Cys²³⁸ e Cys²⁴³. Esta região regula a atividade catalítica e a resposta do ligante acoplado ao grupamento heme (Martin *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2001; Stasch *et al.*, 2001), e tem sua atividade intensificada na presença do NO (Brioni *et al.*, 2002). Trabalhos realizados em anéis de aorta de coelho e em culturas de células

endoteliais mostraram que o YC-1 aumenta o acúmulo de GMPc, sendo este efeito potencializado pelo NO (Wohlfart *et al.*, 1999). Na presença de inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), como L-NAME, o efeito do YC-1 é diminuído, indicando a existência de uma ação sinérgica entre o YC-1 e o NO endógeno (Wohlfart *et al.*, 1999).

1.8.3 BAY 41-2272

O BAY 41-2272 (5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1*H*-pirazol[3, 4-*b*]piridin-3-il]-pirimidin-4-ilamina; figura 3) e seu análogo, BAY 41-8543, são moléculas com características e mecanismos similares ao YC-1. Foram descritos como ativadores da guanilil ciclase solúvel, porém, muito mais potentes e desprovidos de atividade

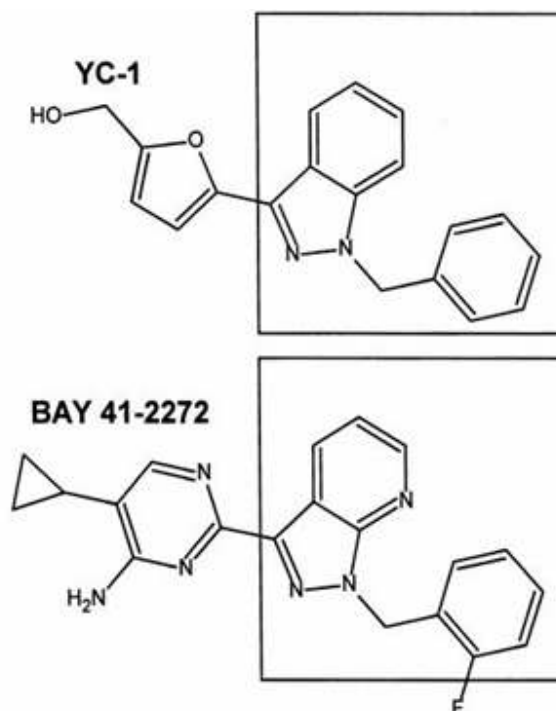


Figura 3: Estrutura química do YC-1 e seu análogo BAY 41-2272 (Stasch *et al.*, 2001).

inibitória sobre a PDE-5 (Stasch *et al.*, 2001; 2002a). Experimentos *in vitro* mostraram uma potente ativação da guanilil ciclase solúvel pelo BAY 41-2272, a qual é potencializada na presença de doador de NO (Stasch *et al.*, 2001). Estudos mostraram que o BAY 41-2272 não ativa enzimas desprovidas do grupamento heme, indicando que este composto provavelmente ativa a guanilil ciclase solúvel na porção amino terminal (onde se encontra o grupamento heme), através de mecanismos independentes de NO (Stasch *et al.*, 2001).

Em ratos normotensos e hipertensos, o BAY 41-2272 diminuiu a pressão arterial sistêmica e prolongou o tempo de sangramento (Stasch *et. al.*, 2001, 2002b; Straub *et. al.*,

2002; Boerrigter *et al.*, 2003). Trabalhos subsequentes mostraram que o BAY 41-2272 induz relaxamento vascular em anéis aórticos *in vitro* e redução da pressão arterial em ratos normotensos e hipertensos (Straub *et al.*, 2002). Demonstrou-se também que a vasodilatação induzida por este composto não causa tolerância como os nitratos orgânicos (Stasch *et al.*, 2002b). O BAY 41-2272 aumentou o débito cardíaco e preservou a função renal em modelo de insuficiência cardíaca congestiva experimental e preveniu a hipertrofia cardíaca e a fibrose induzidas pelo bloqueio crônico de NO em ratos (Boerrigter *et al.*, 2003; Zanfolin *et al.*, 2006). O BAY 41-2272 também induz relaxamento *in vitro* de aorta de coelhos, corpo cavernoso de coelhos e humanos, tecido vaginal e clitoral de coelhas, e promove ereção peniana em coelhos (Baracat *et al.*, 2003; Kalsi *et al.*, 2003; Cellek, 2003; Bischoff *et al.*, 2003; Priviero *et al.*, 2005). Adicionalmente, demonstrou-se que o BAY 41-2272 interage com o NO endógeno e exógeno, causando potente relaxamento do músculo anococcígeo de rato (Teixeira *et al.*, 2006a).

Recentemente, em modelos de hipertensão pulmonar aguda induzida pelo U46619 (análogo de tromboxano) em caprinos, demonstrou-se que a infusão do BAY 41-2272 reduz a pressão média da artéria pulmonar e a resistência vascular pulmonar, e aumenta a produção de GMPc (Evgenov *et al.*, 2004). Entretanto, doses maiores do BAY 41-2272 elevaram também o índice cardíaco e causaram vasodilatação sistêmica. A inibição farmacológica da NOS aboliu os efeitos vasodilatadores pulmonares, mas não os efeitos sistêmicos do BAY 41-2272. Embora o BAY 41-2272 atue independentemente da produção de NO endógeno na vasculatura pulmonar, o NO endógeno parece ser requerido para a resposta vasodilatadora sistêmica. Além disso, o BAY 41-2272 potencializou a vasodilatação induzida pelo NO inalado (Evgenov *et al.*, 2004). Efeitos hemodinâmicos semelhantes foram relatados no modelo de hipertensão pulmonar persistente do recém-

nascido em caprinos. Comparado ao sildenafil, a resposta da vasodilatação pulmonar em resposta ao BAY 41-2272 é mais prolongada (Deruelle *et al.*, 2005a;b). Além disso, em modelos de hipertensão pulmonar crônica em roedores, trabalhos recentes mostram que o tratamento com BAY 41-2272 (ou BAY 58-2667) atenuou marcadamente o aumento na pressão sistólica ventricular direita, hipertrofia ventricular direita e remodelamento vascular pulmonar (Deruelle *et al.*, 2006; Dumitrascu *et al.*, 2006).

A perspectiva de um estimulador da guanilil ciclase solúvel aumentar a eficácia do NO inalado, em pacientes hipertensos pulmonares sugere que doses menores de NO inalatório possam ser usadas, facilitando terapias crônicas que utilizam este tratamento (Evgenov *et al.*, 2006). Assim esta nova classe de compostos representada pelo BAY 41-2272, com perfil farmacológico diferente dos clássicos doadores de NO, pode fornecer meios alternativos de tratamento eficaz para pacientes com hipertensão pulmonar.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi o de investigar os potenciais efeitos protetores do BAY 41-2272 sobre a hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina e hipóxia em cães anestesiados.

1.9.2 Objetivos específicos

Em cães anestesiados submetidos à hipertensão pulmonar por hipóxia ou pela formação do complexo heparina-protamina, nos propusemos a:

- 1) Investigar os efeitos do BAY 41-2272 sobre a pressão arterial média (PAM), pressão média da artéria pulmonar (PMAP), frequência cardíaca (FC), índice cardíaco (IC), pressão capilar pulmonar (PcP), índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) e índice de resistência vascular pulmonar (IRVP);
- 2) Investigar os efeitos do BAY 41-2272 sobre a pressão de saturação de oxigênio (SpO_2);
- 3) Investigar os efeitos do BAY 41-2272 sobre os níveis plasmáticos de GMPC.
- 4) Investigar os efeitos do BAY 41-2272 no tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA) (no caso da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina).

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados cães machos beagles(n=12) e cães sem raça definida (SRD, n=18), adultos, pesando de 8 a 15 Kg, procedentes do canil do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP). Os protocolos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética animal (CEEA: <http://www.ib.unicamp.br/ceea>) do Instituto de Biologia da UNICAMP, parecer nº 595–1, aprovado em 03 de outubro de 2003 (em anexo).

2.2 Procedimento experimental

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol[®] 30 mg/kg, i.v.). Após instalação da anestesia, os animais 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, Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). A anestesia foi mantida combinando-se citrato de fentanila (Fentanil[®], 0.01 mg/kg/h) e diazepam (Compaz[®], 0.25 mg/kg/h). A frequência respiratória e o volume inspiratório foram mantidos em 20 bpm e 13 ml/kg do peso do animal, respectivamente. Um oxímetro de pulso foi conectado para mensuração da pressão de saturação de oxigênio (SpO₂) através de um sensor transcutâneo acoplado na língua do animal (EMAI Model, OX-P-10, Transmai, São Paulo, SP, Brasil).

A artéria femoral esquerda foi canulada a fim de se registrar a pressão arterial sistêmica, através de transdutor de pressão (MX-860, Medex, Columbus, OH, 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 Laboratories, Santa Ana, CA, EUA; figura 4) o qual foi colocado na artéria pulmonar (figura 5). O termistor foi conectado ao cabo do debitômetro. Os encaixes dos lúmens proximal e distal foram conectados a transdutores de pressão (MX-860, Medex, EUA) onde permitiu-se o registro da pressão da artéria pulmonar e da pressão de átrio direito, respectivamente.

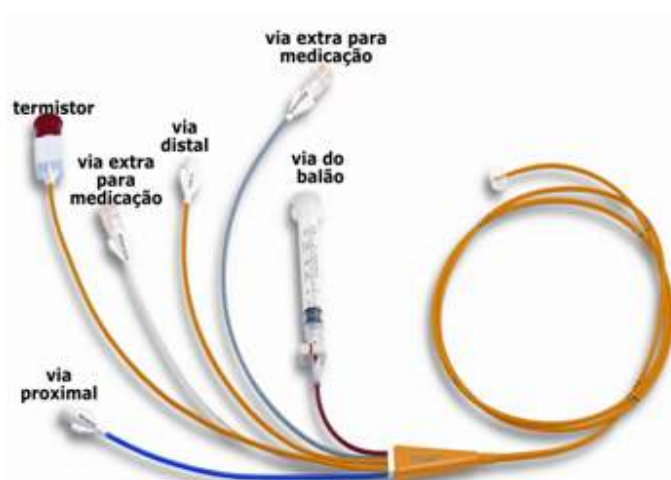


Figura 4: Representação esquemática do catéter de Swan-Ganz. Fonte: www.unifesp.br

O catéter de Swan-Ganz permitiu ainda a obtenção do débito cardíaco pela técnica

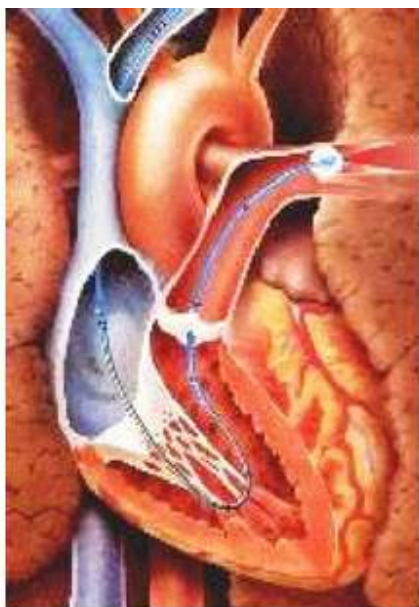


Figura 5: Representação esquemática do catéter de Swan-Ganz locado na artéria pulmonar. Fonte: www.Anesthesia.iu.edu

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 da solução injetada à medida em que a coluna de líquido se desloca pelo sangue (figura 6), fornecendo em instantes o débito cardíaco do animal em litros/min. O débito cardíaco, 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, São Paulo, SP, Brasil).

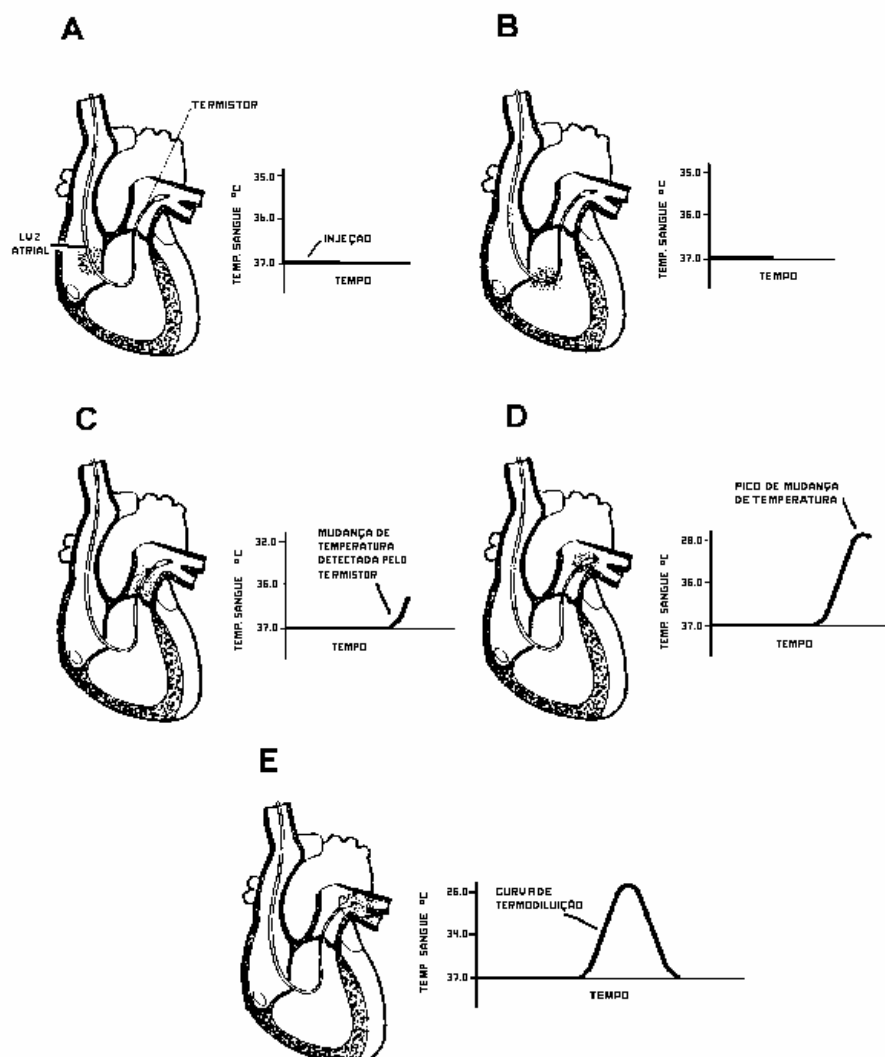


Figura 6: Determinação do débito cardíaco pela técnica de termodiluição. As alterações na temperatura da solução injetada são captadas pelo termistor localizado a 4 cm da extremidade do catéter.

2.3 Obtenção dos parâmetros hemodinâmicos

Os parâmetros hemodinâmicos medidos foram: 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 mensurada insuflando-se o balão que se encontra na extremidade do catéter de Swan Ganz.

A partir destes dados, os valores de outras variáveis hemodinâmicas foram obtidos indiretamente, tais como resistência vascular sistêmica (RVS) e resistência vascular pulmonar (RVP), cujas fórmulas são as seguintes:

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

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

Para as resistências vasculares, 80 é o fator que transforma a unidade de resistência de mmHg/l/min para D.s/cm⁵.

No entanto, considerando-se a variação do peso dos animais (mínimo de 8.0 e máximo de 15.0 Kg), optamos por expressar os resultados de DC, RVS e RVP como índices, os quais estão corrigidos pela área de superfície corporal (distância naso-anal e o peso dos animais). Desta forma, o DC foi expresso como índice cardíaco (IC), e as resistências vasculares como índice de resistência vascular sistêmica (IRVS) e índice de resistência vascular pulmonar (IRVP). As fórmulas utilizadas para os cálculos são as seguintes:

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

$$IRVS = RVS \times ASC$$

$$IRVP = RVP \times ASC$$

2.4 Protocolos experimentais

2.4.1 Indução de hipertensão pulmonar pela reversão do efeito anticoagulante da heparina pela protamina

Após um período de repouso do animal (30 min), avaliamos os parâmetros hemodinâmicos no tempo zero, 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 após a injeção da heparina. No 3º minuto após a injeção da heparina, administramos intravenosamente 10 mg/kg de protamina (*bolus*). Os parâmetros hemodinâmicos passaram a ser reavaliados a cada minuto durante os primeiros 5 minutos, e aos 10 e 15 minutos após a injeção da protamina. Visto que o BAY 41-2272 é dissolvido em DMSO 30% (0.1 ml/kg/min), todo este procedimento foi realizado durante infusão deste veículo; esta infusão iniciou 10 min antes da injeção de heparina, mantendo-se a mesma até os 15 min após a administração de protamina. Neste grupo (chamado de controle) foi utilizado um *n* de 8 animais. Um grupo adicional de 3 cães recebeu apenas a infusão deste veículo, na ausência de injeção de heparina-protamina. No grupo de cães que recebeu o BAY 41-2272, a droga (dissolvida em DMSO 30%), foi infundida na concentração de 10 µg/kg/min. A infusão iniciou-se 10 min antes da injeção da heparina, mantendo-se até os 15 min após a administração da protamina. Os parâmetros hemodinâmicos foram mensurados nos mesmos tempos do grupo controle. Neste grupo foi utilizado um *n* de 8 animais.

2.4.2 Indução de hipertensão pulmonar por hipóxia

Após estabilização da hemodinâmica dos cães com ar ambiente ($FiO_2=21\%$), avaliamos os parâmetros hemodinâmicos nos tempo zero, 5, 10 e 15 min. Após 15 min, os animais foram submetidos a uma baixa tensão de oxigênio ($FiO_2=12\%$). Os parâmetros hemodinâmicos foram avaliados nos tempos de 1, 5, 10 e 15 minutos após a instalação da hipóxia. Em seguida, os animais foram submetidos à normóxia (ar ambiente) e os parâmetros hemodinâmicos foram novamente avaliados nos tempos de 1, 5, 10 e 15 min. Este método foi associado à análise da oximetria de pulso arterial para confirmação da hipoxemia. Visto que o BAY 41-2272 é dissolvido em DMSO 30%, todo este procedimento foi realizado durante infusão deste veículo; esta infusão iniciou-se 10 min antes da instalação da hipóxia, mantendo-se a mesma até os 15 min após normóxia. Neste grupo (chamado de controle) foi utilizado um n de 6 animais. Um grupo adicional de 3 cães recebeu apenas a infusão deste veículo, na ausência da instalação da hipóxia. No grupo de cães que recebeu o BAY 41-2272, a droga foi infundida na concentração de 10 $\mu\text{g/kg/min}$, cujo início da infusão se deu aos 10 min antes da instalação da hipóxia, mantendo-se a mesma até os 15 min após a reinstalação da normóxia. Os parâmetros hemodinâmicos foram mensurados nos mesmos tempos do grupo controle. Neste grupo foi utilizado um n de 5 animais.

2.4.3 Determinação da concentração plasmática de GMPc

Amostras de sangue (3 ml) foram coletadas da veia femural em seringas heparinizadas. Imediatamente após a coleta, as amostras foram colocadas em presença de

0,1 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX). No grupo de hipertensão pulmonar induzido pela heparina-protamina, as amostras de sangue venoso foram coletadas nos seguintes períodos: (1) antes da administração da heparina, (2) 2 min após a injeção da protamina e (3) 15 min após a injeção de protamina. No modelo de hipertensão pulmonar induzida por hipóxia, as amostras de sangue foram coletadas nos seguintes períodos: (1) antes da infusão do BAY 41-2272, (2) 5 min após a instalação da hipóxia e (3) 15 min da normóxia. As amostras de sangue foram centrifugadas à 3.000 rpm por 10 minutos e congeladas para medida da concentração plasmática de GMPc por técnica de imunoensaio enzimático. A preparação das amostras e dos padrões, bem como a incubação com o anticorpo foram seguidas de acordo com os procedimentos descritos no kit comercial (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram feitos em duplicatas.

2.4.4 Determinação da concentração plasmática do tempo de trombroplastina parcial ativado

Amostras de sangue foram coletadas da veia femoral de cães em tubos de vacutainer citratados (0,5 ml de citrato de sódio para 4,5 ml de sangue total). Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). O plasma foi separado e utilizado para a análise do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPA). O TTPA consiste na determinação do tempo de coagulação do PPP citratado, após adição de um ativador da fase de contato da coagulação, a cefalina (plasma ativado), que substitui o fosfolipídio da membrana plaquetária. O cálcio é adicionado e reverte a ação do citrato. As amostras de PPP foram incubadas em banho maria a 37°C. Alíquotas de 100 µl das amostras de PPP foram separadas em tubos de ensaio apropriados e

incubadas a 37°C com o ativador (cefalina) por um tempo de 3 min. Após este período, adiciona-se imediatamente o cálcio e é acionado simultaneamente o cronômetro, homogeneizando as amostras até a formação do coágulo. As amostras foram testadas em triplicatas e os valores foram expressos em segundos.

2.5 Análise estatística

Os dados estão expressos como médias $\pm$ erro padrão das medias (E.P.M.) para n experimentos. Foi empregado análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Dunnett (comparação com o basal) e Turkey (comparação entre grupos). As análises foram realizadas utilizando-se o software Graphpad Instat versão 3.00, US 1990. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

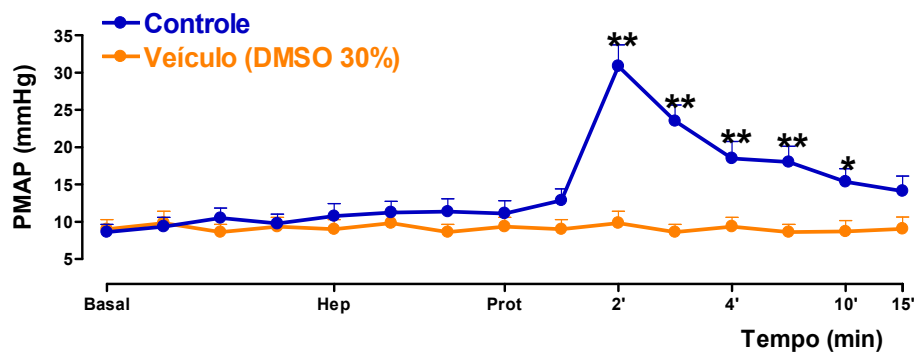
RESULTADOS

3.1. Alterações hemodinâmicas induzidas pelo complexo heparina-protamina

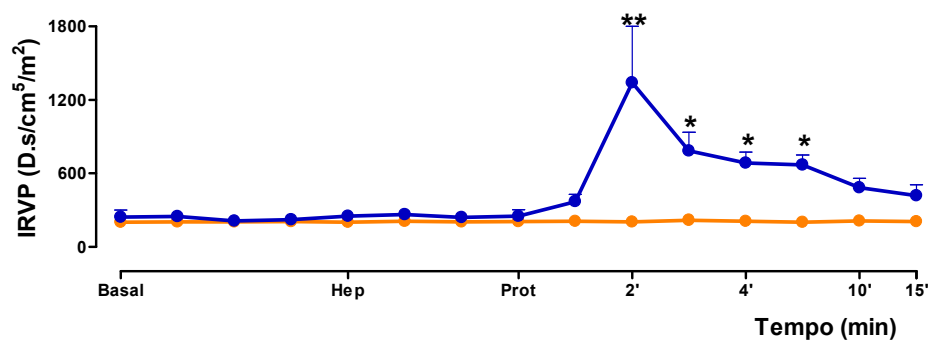
Os valores hemodinâmicos basais da pressão média da artéria pulmonar (PMAP), do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP), da pressão arterial média (PAM), do índice de resistência vascular sistêmica (IRVS), da frequência cardíaca (FC) e do índice cardíaco (IC) foram, respectivamente, $8,6 \pm 1,0$ mmHg; $253,7 \pm 49,3$ D.s/cm⁵/m²; $91,4 \pm 8,5$ mmHg; $2824,4 \pm 320,3$ D.s/cm⁵/m²; $114,4 \pm 7,6$ bpm; $2,7 \pm 0,3$ l/min/m² (figura 7).

A injeção intravenosa de heparina (Hep; 500 UI/kg, *bolus*) não modificou de modo significativo estes valores basais em nenhum dos tempos avaliados (figura 7, painéis de A a F). Entretanto, a administração subsequente de protamina (Prot; 10 mg/kg, *bolus*), causou um aumento de aproximadamente 350% da PMAP, acompanhada por um aumento significativo IRVP (figura 7 A e B). O aumento da PMAP e do IRVP foi significativo nos tempos de 2, 3, 4 e 5 e/ou 10 min após a administração da protamina. Paralelamente, observamos um aumento significativo da pressão capilar pulmonar, medida 2 min após administração da protamina (tabela 1). Concomitante à hipertensão pulmonar, observamos uma redução significativa da PAM aos 2, 3, 4 e 5 min após administração da protamina (figura 7 C). O IRVS não sofreu alterações significativas (figura 7 D). Além disso, observamos um aumento significativo da FC aos 2 minutos após a administração da protamina (figura 7 E) e leve tendência a diminuição do IC (figura 7 F). A administração do veículo na ausência de injeção de heparina-protamina, não alterou significativamente nenhum dos parâmetros hemodinâmicos estudados (figura 7 A-F).

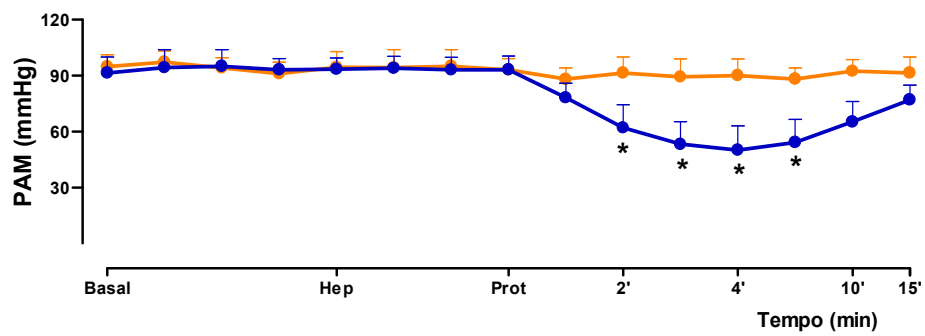
A



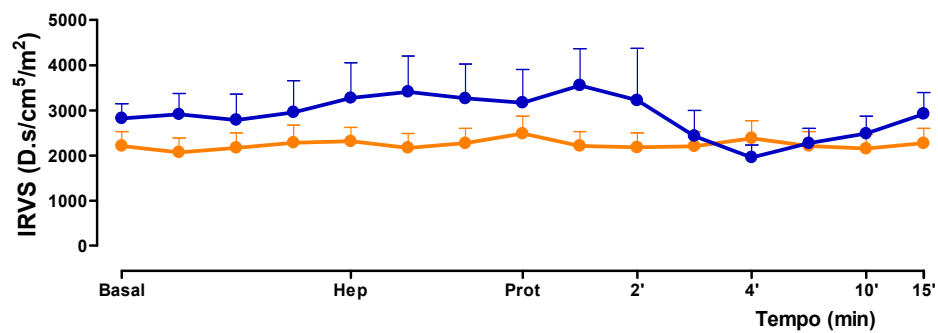
B



C



D



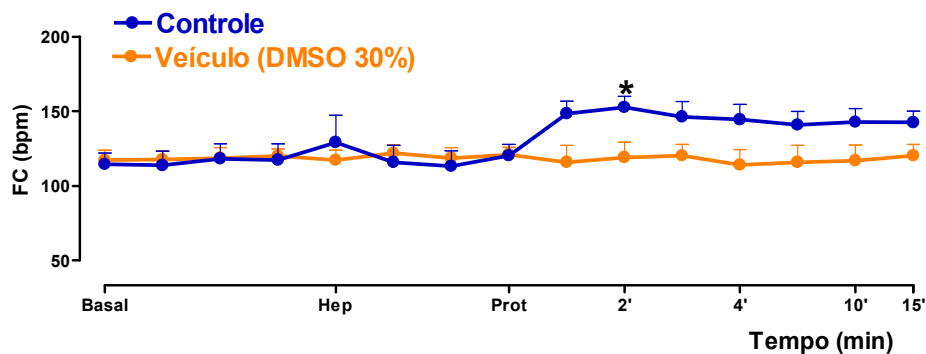
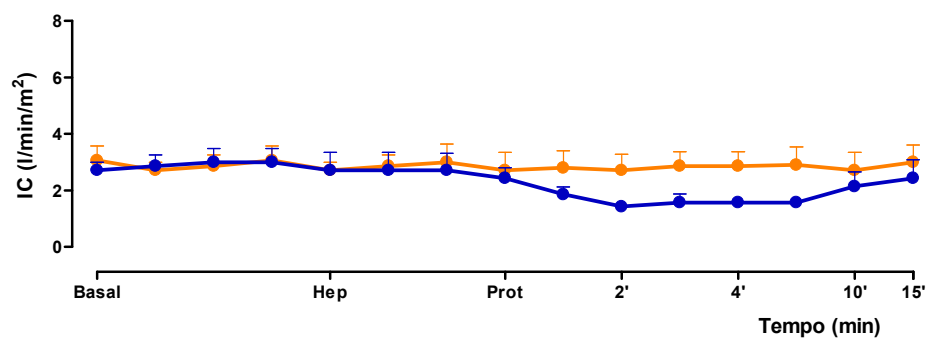
E**F**

Figura 7: Alterações hemodinâmicas induzidas pelo complexo heparina-protamina. A) Pressão média da artéria pulmonar (PMAP); B) índice de resistência vascular pulmonar (IRVP); C) Pressão arterial média (PAM); D) Índice de resistência vascular sistêmica (IRVS); E) Frequência cardíaca (FC); F) Índice cardíaco (IC); Heparina (Hep); Protamina (Prot). O veículo consistiu de infusão de 30 % de DMSO. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para 8 animais no grupo controle e 3 no grupo veículo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao basal.

Tabela 1: Efeitos do BAY 41-2272 sobre a pressão capilar pulmonar nos cães submetidos ao complexo heparina-protamina. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para 7 cães no grupo controle e 5 no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 $\mu\text{g/kg/min}$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em relação ao basal; # $p < 0,05$ em relação ao respectivo controle. CHP, complexo heparina-protamina.

	Pressão capilar pulmonar (mmHg)	
	Controle	BAY 41-2272
Basal	3,3 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 1,6
Heparina	2,8 $\pm$ 0,8	4,4 $\pm$ 1,5
CHP (2 min)	10,1 $\pm$ 1,4 **	7,6 $\pm$ 2,8 * #
CHP (15 min)	5,1 $\pm$ 1,2	3,6 $\pm$ 1,5

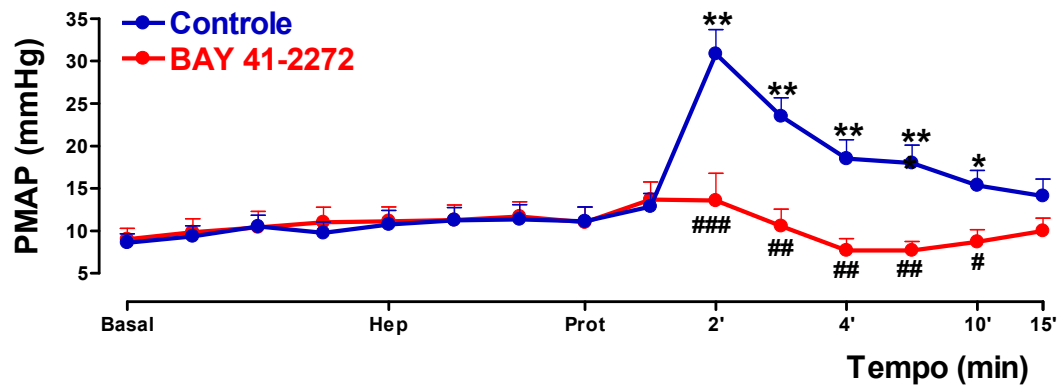
3.2 Efeitos do BAY 41-2272 nas alterações hemodinâmicas decorrentes do complexo heparina-protamina

Nos animais tratados com BAY 41-2272 (10 µg/Kg/min), observamos que o aumento da PMAP e do IRVP decorrente da interação heparina-protamina foi praticamente abolido (Figura 8 A e B). Do mesmo modo, nestes animais, observamos que o aumento da pressão capilar pulmonar foi significativamente atenuado pelo BAY 41-2272 (Tabela 1).

Por outro lado, é interessante notar que o tratamento com BAY 41-2272 potencializou a redução da PAM após administração de protamina (Figura 9 A). O IRVS não apresentou alterações significativas em relação ao basal em nenhum grupo, mas podemos observar que houve uma diminuição significativa no IRVS quando comparamos o grupo BAY 41-2272 com o grupo controle (Figura 9 B).

No grupo tratado com o BAY 41-2272 notamos um aumento significativo da FC antes da administração da heparina (Figura 10 A). Entretanto, o aumento da FC após a administração de protamina não diferiu entre os grupos tratado e controle. Em relação ao IC, observamos um aumento inicial (antes da administração da heparina) seguido de uma queda significativa após a administração da protamina (Figura 10 B).

A



B

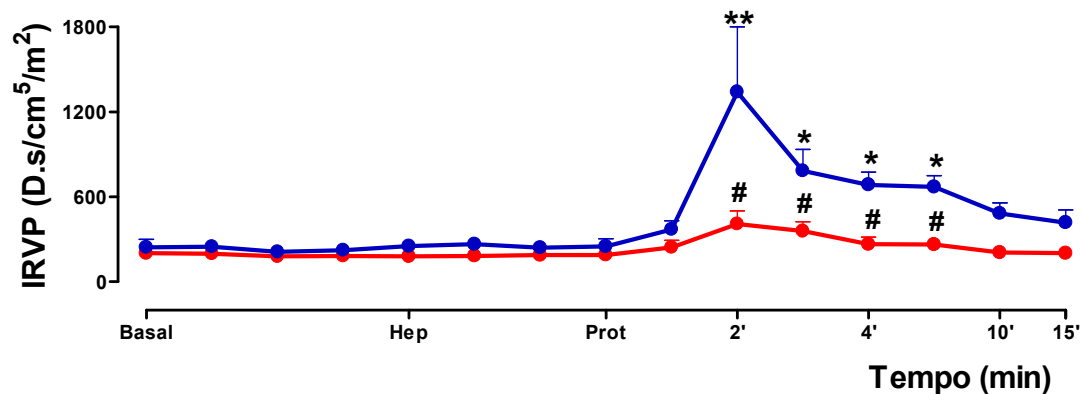
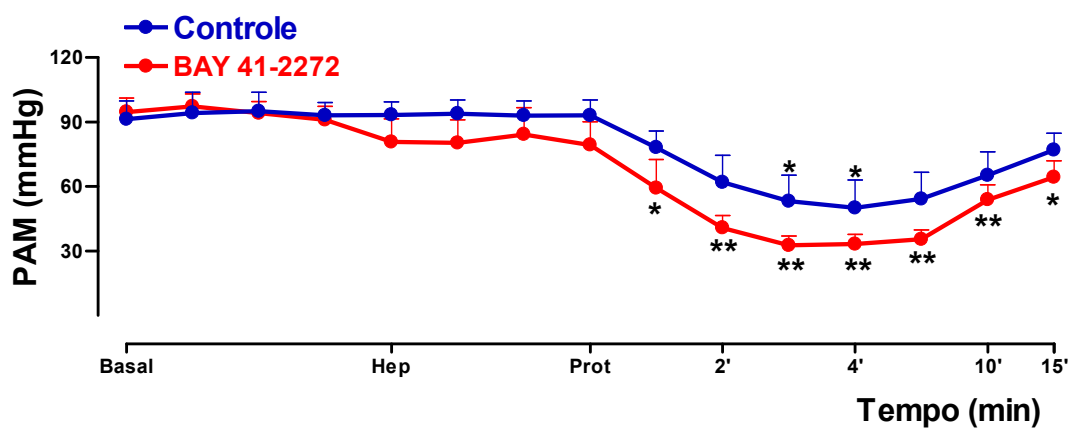


Figura 8: Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão média da artéria pulmonar (PMAP; painel A) e do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP; painel B) decorrentes do complexo heparina-protamina. A administração de heparina (Hep; 500 UI/kg) foi realizada 3 minutos antes de protamina (Prot; 10 mg/kg) para os grupos Controle (n=8) e BAY 41-2272 (10 µg/kg/min; n= 8). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. para *n* animais. **p*<0,05, ***p*<0,01 em relação ao basal; ###*p*<0,0001; ##*p*<0,001; # *p*<0,05 em relação ao controle.

A



B

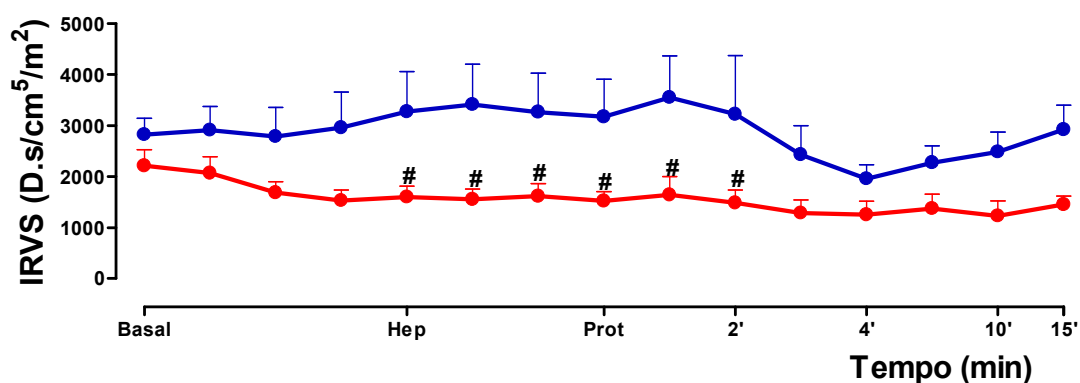
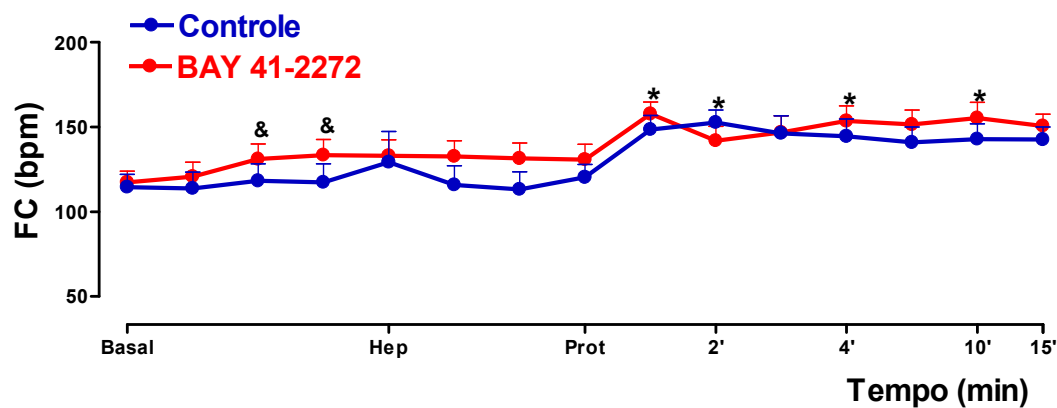


Figura 9: Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; painel A) e índice resistência vascular sistêmica (IRVS; painel B) decorrentes do complexo heparina-protamina. A administração de heparina (Hep; 500 UI/kg) foi realizada 3 minutos antes de protamina (Prot; 10 mg/kg) para os grupos Controle (n=8) e BAY 41-2272 (10 µg/kg/min; n= 8). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. para *n* animais, **p*<0,05, ***p*<0,01 em relação ao basal; #*p*<0,05 em relação ao controle.

A



B

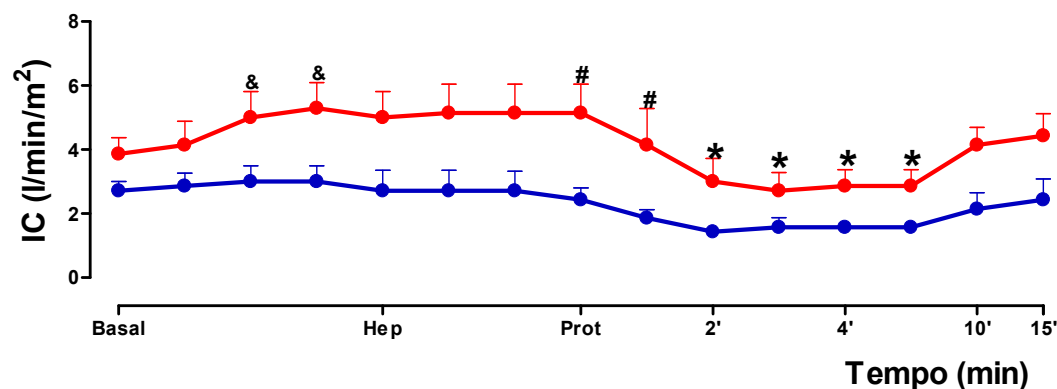


Fig. 10: Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da frequência cardíaca (FC; painel A) e índice cardíaco (IC; painel B) decorrentes do complexo heparina-protamina. A administração de heparina (Hep; 500 UI/kg) foi realizada 3 minutos antes de protamina (Prot; 10 mg/kg) para os grupos Controle (n=8) e BAY 41-2272 (10 µg/kg/min; n= 8). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. para *n* animais. &,*p<0,05, em relação ao basal; #p<0,05 em relação ao controle.

3.2.1 Saturação de oxigênio na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina

Na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina observamos uma diminuição significativa da saturação de oxigênio, a qual foi atenuada significativamente no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min) (tabela 2).

Tabela 2: Efeitos do BAY 41-2272 sobre a saturação do oxigênio (SpO₂) nos cães submetidos ao complexo heparina-protamina. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. para 7 cães no grupo controle e 6 no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min iv). *p<0,05, **p<0,001 em relação ao basal; #p<0,01, em relação ao respectivo controle. CHP, complexo heparina-protamina.

	SpO ₂ (mmHg)	
	Controle	BAY 41-2272
Basal	88,8 ± 1,2	94,2 ± 1,4
Heparina	80,0 ± 1,6	93,5 ± 2,2
CHP (2 min)	72,7 ± 1,4 **	85,2 ± 1,9 * #
CHP (15 min)	84,6 ± 3,2	89,0 ± 2,1

3.2.2 Níveis Plasmáticos de GMPc

A medida dos níveis plasmáticos de GMPc foi realizada aos 2 min após a formação do complexo heparina-protamina (pico da hipertensão pulmonar). Notamos que os níveis deste segundo mensageiro encontraram-se significativamente elevados no grupo tratado com o BAY 41-2272 em relação ao grupo controle e valores basais (figura 11).

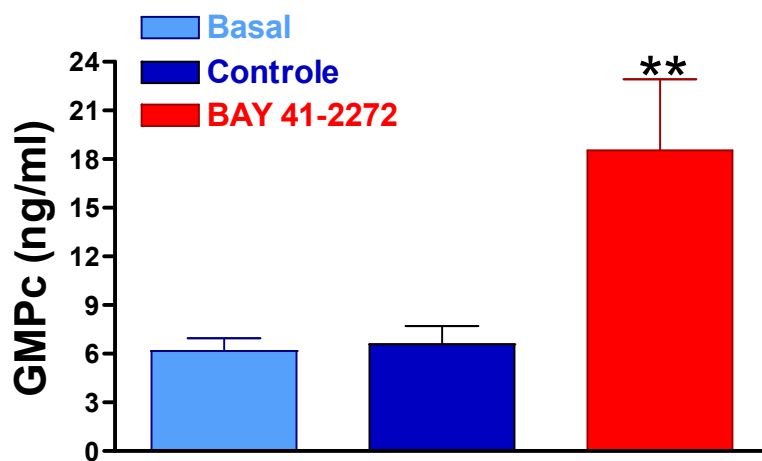


Fig 11: Efeitos do BAY 41-2272 sobre os níveis plasmáticos de GMPc em cães controles e tratados com BAY 41-2272. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para 8 cães no grupo controle e 8 cães no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 μ g/kg/min). Os valores basais representam os níveis de GMPc em todos os animais, antes da injeção de heparina. ** $p < 0,01$ em relação ao basal.

3.2.3 Tempo de tromboplastina parcial ativado

Para medida do TTPA, amostras de plasma foram incubadas *in vitro* com o veículo do BAY 41-2272 (DMSO 30%) ou com o próprio BAY 41-2272 (10 μ M). Em seguida, foram incubados com heparina (0,2 UI/ml) seguido ou não de protamina (300 μ g/ml).

Nossos resultados mostraram que o TTPA encontrou-se significativamente elevado no plasma tratado com heparina, retornando aos níveis basais após a adição de protamina, conforme esperado. No plasma tratado com BAY 41-2272, o tempo de TTPA na presença de heparina-protamina não diferiu do grupo veículo (tabela 3).

Tabela 3: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) *in vitro*. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. *** $p < 0.001$ e * $p < 0.05$ em relação ao basal.

	TTPA (seg)
Basal (controle)	14,0 $\pm$ 0,01
Heparina (controle)	21,3 $\pm$ 0,6 ***
Heparina + protamina (controle)	14,3 $\pm$ 0,3
Heparina + protamina (veículo)	17,3 $\pm$ 0,2 *
Heparina + protamina (BAY 41-2272)	16,0 $\pm$ 0,6 *

3.3 Hipertensão pulmonar induzida por hipóxia

Após estabilização dos animais com ar ambiente ($\text{FiO}_2=21\%$), os mesmos foram submetidos a baixa tensão de oxigênio ($\text{FiO}_2=12\%$). Nesta circunstância, a pressão média da artéria pulmonar elevou-se em aproximadamente 280%, 240% e 225% nos tempos de 5, 10 e 15 minutos, respectivamente, retornando aos níveis basais após a interrupção da hipóxia (no início da normóxia). A administração do veículo na ausência da hipóxia (normóxia), não alterou significativamente estes parâmetros hemodinâmicos estudados (figura 12).

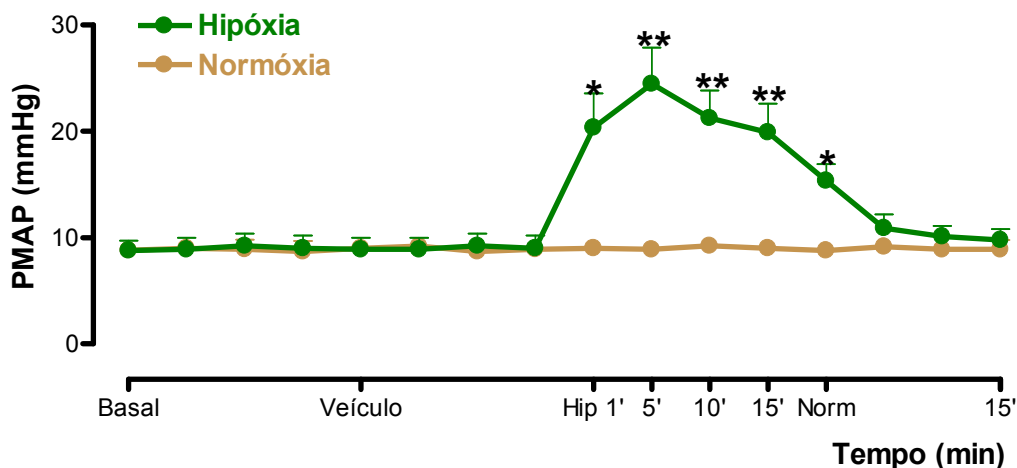


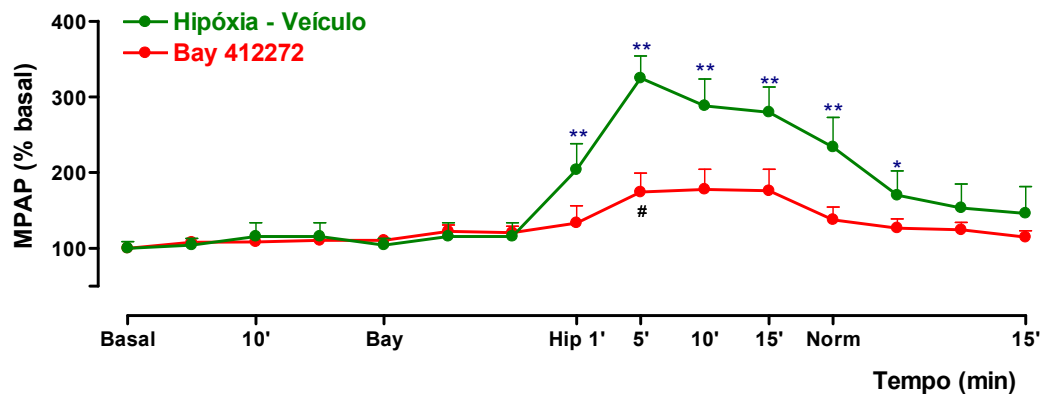
Figura 12: Alterações da pressão média da artéria pulmonar (PMAP). Após estabilização com ar ambiente ($\text{FiO}_2=21\%$), os animais foram submetidos à baixa tensão de oxigênio ($\text{FiO}_2=12\%$), hipóxia (Hip); normóxia (Norm). O veículo consistiu de infusão de 30 % de DMSO. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para 6 animais no grupo hipóxia e 3 no grupo normóxia * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ em relação aos valores basais.

3.4 Efeitos do BAY 41-2272 nas alterações hemodinâmicas decorrentes da hipóxia

Nos animais tratados com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min), observamos que o aumento da PMAP e do IRVP decorrente da hipóxia foi reduzido significativamente, em relação ao grupo controle (Figura 13). O aumento da PcP foi significativamente atenuado no grupo tratado com BAY 41-2272 (Tabela 4).

O tratamento com BAY 41-2272 não interferiu significativamente na PAM, mas reduziu significativamente o IRVS quando comparamos com o grupo controle (Figura 14). Em relação à FC e o IC, não observamos diferenças significativas entre o grupo controle e o tratado com BAY 41-2272 (Figura 15).

A



B

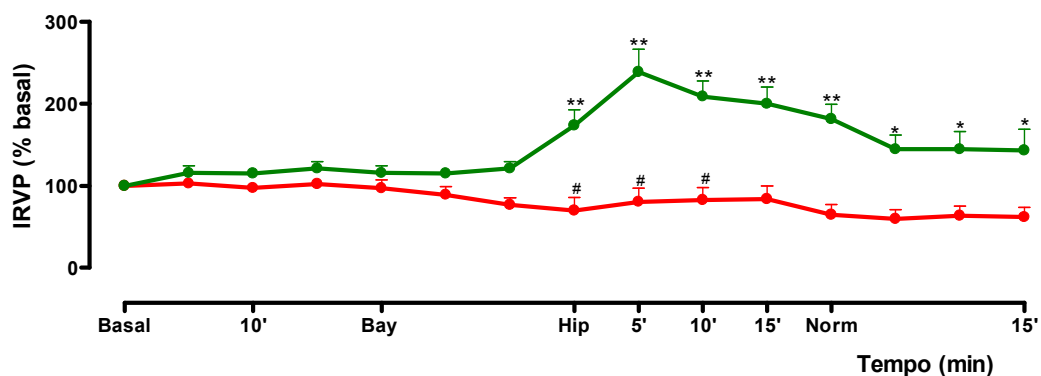
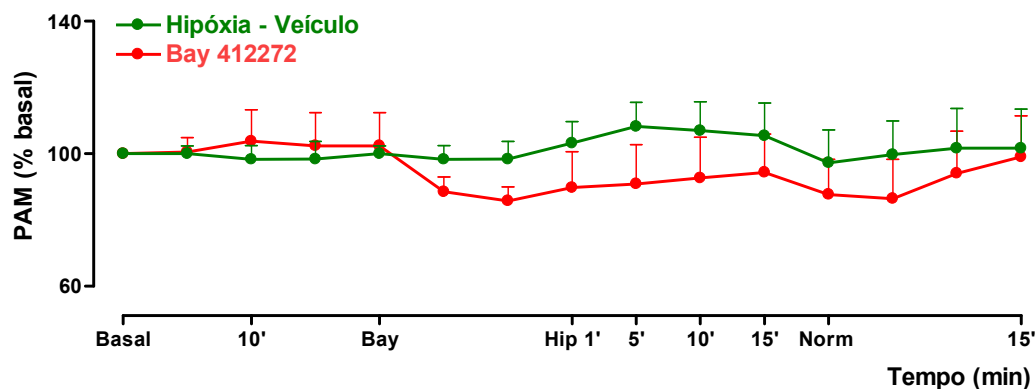


Figura 13: Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão média da artéria pulmonar (PMAP; painel A) e do índice de resistência vascular pulmonar (IRVP; painel B) decorrentes de hipóxia. Após estabilização com ar ambiente ($\text{FiO}_2=21\%$), os animais foram submetidos à baixa tensão de oxigênio ($\text{FiO}_2=12\%$) para os grupos hipóxia-veículo, ($n=6$) e BAY 41-2272 ($10 \mu\text{g/kg/min}$, $n=5$). Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M.. ** $p<0,005$ em relação ao basal e # $p<0,05$ em relação ao controle.

A



B

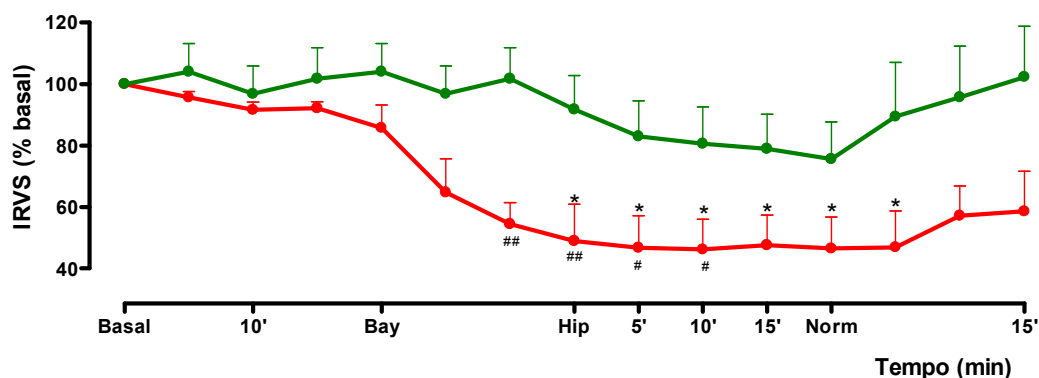
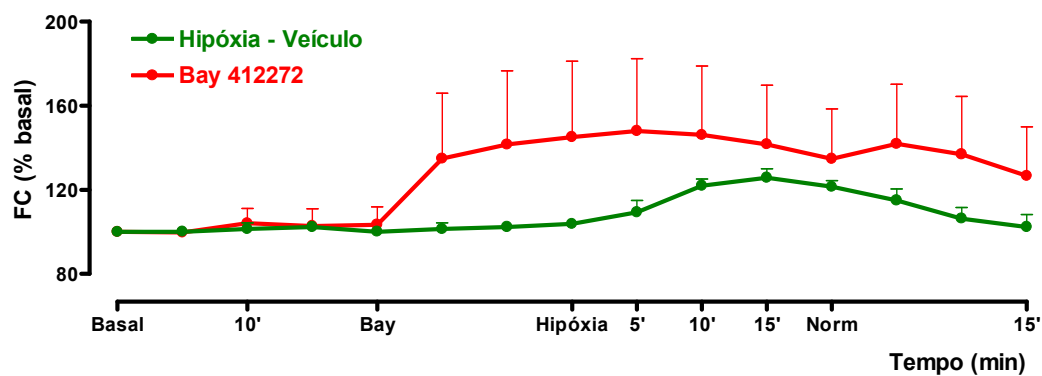


Figura 14: Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; painel A) e índice resistência vascular sistêmica (IRVS; painel B) decorrentes de hipóxia. Após estabilização com ar ambiente ($FiO_2=21\%$), os animais foram submetidos à baixa tensão de oxigênio ($FiO_2=12\%$) para os grupos hipóxia-veículo ($n=6$) e BAY 41-2272 ($10 \mu\text{g/kg/min}$, $n=5$). Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. * $p<0,05$ em relação ao basal e $^{##}p<0,01$; $^{\#}p<0,05$ em relação ao controle.

A



B

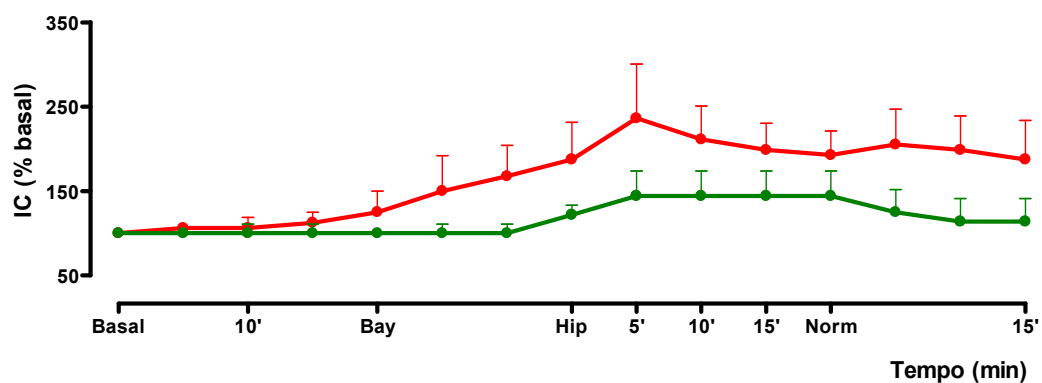


Figura 15: Efeitos do BAY 41-2272 sobre as alterações da frequência cardíaca (FC; painel A) e índice cardíaco (IC; painel B) decorrentes de hipóxia. Após estabilização com ar ambiente ($FiO_2=21\%$), os animais foram submetidos à baixa tensão de oxigênio ($FiO_2=12\%$) para os grupos hipóxia-veículo ($n=6$) e BAY 41-2272 ($10 \mu\text{g/kg/min}$, $n=5$). Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M.

Tabela 4: Efeitos do BAY 41-2272 sobre a pressão capilar pulmonar nos cães submetidos à hipóxia. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para 6 cães no grupo hipóxia e 5 no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 μ g/kg/min). *p<0,05 em relação ao basal, [#]p<0,05 em relação ao respectivo controle.

	Pressão capilar pulmonar (mmHg)	
	Controle	BAY 41-2272
Basal	3,4 $\pm$ 0,9	2,4 $\pm$ 0,7
Hipóxia	9,4 $\pm$ 1,8 *	6,0 $\pm$ 1,1 * [#]
Normóxia	3,2 $\pm$ 1,0	3,0 $\pm$ 0,9

3.4.1 Saturação de oxigênio na hipertensão pulmonar induzida por hipóxia

Na hipertensão pulmonar induzida por hipóxia observamos uma diminuição significativa da saturação de oxigênio, a qual foi atenuada significativamente no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min) (tabela 5).

Tabela 5: Efeitos do BAY 41-2272 sobre a saturação do oxigênio (SpO₂) nos cães submetidos à hipóxia. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. para 6 cães no grupo hipóxia e 5 no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min). **p<0,001 em relação ao basal, #p<0,05 em relação ao respectivo controle.

	SpO ₂ (mmHg)	
	Controle	BAY 41-2272
Basal	93.8 ± 0.8	96.0 ± 0.6
Hipóxia	69.7 ± 2.6**	76.5 ± 1.5** #
Normóxia	94.6 ± 0.6	96.7 ± 0.5

3.4.2 Níveis Plasmáticos de GMPc

A medida dos níveis plasmáticos de GMPc foi realizada aos 5 min após a instalação da hipóxia (pico da hipertensão pulmonar). Notamos que os níveis deste segundo mensageiro encontraram-se significativamente elevados no grupo tratado com o BAY 41-2272 em relação ao grupo controle e valores basais. (figura 16)

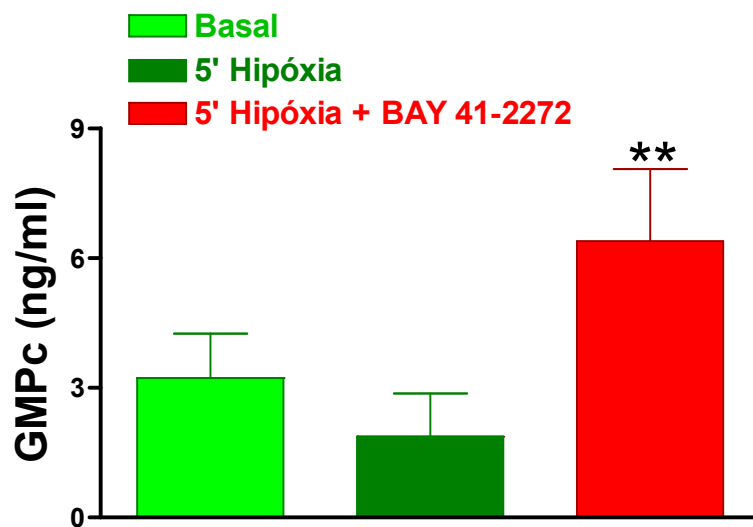


Figura 16: Efeitos do BAY 41-2272 sobre os níveis plasmáticos de GMPc em cães submetidos à hipóxia e tratados com BAY 41-2272. Os valores estão expressos como média $\pm$ E.P.M. para 6 cães no grupo hipóxia e 5 cães no grupo tratado com BAY 41-2272 (10 μ g/kg/min). Os valores basais representam os níveis de GMPc em todos os animais, antes da instalação da hipóxia. ** $p < 0,01$ em relação ao basal.

DISCUSSÃO

A fisiopatologia da hipertensão pulmonar ainda não está completamente elucidada e, embora grandes avanços tenham sido obtidos no conhecimento desta desordem, o tratamento da mesma ainda permanece paliativo para a maioria dos casos (Farber e Loscalo, 2004; Evgenov *et al.*, 2006). Por isso, o ensaio de novas drogas, em animais e seres humanos, tem grande valor científico. Nos últimos anos, novos fármacos (ou novas estratégias farmacocinéticas) foram testados em animais e seres humanos, como antagonistas de receptores de ET-1, análogos da prostaciclina e inibidores da PDE-5, combinados ou não com vasodilatadores (Rich *et al.*, 1992; Barst *et al.*, 1996; Galiè *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2002; Channick *et al.*, 2004; Wilkens *et al.*, 2001; Dias-júnior *et al.*, 2005; Barreto *et al.*, 2005). De modo geral, grande parte dos trabalhos sugere fortemente que os compostos que ativam a via NO-GMPc podem constituir drogas promissoras para o tratamento da hipertensão pulmonar. O presente estudo mostra que o BAY 41-2272, um ativador direto da guanilil ciclase solúvel por mecanismo independente de NO, é capaz de reduzir a hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina ou hipóxia, sugerindo que pode de fato se constituir em droga promissora para tratamento desta patologia.

A fisiopatologia da hipertensão pulmonar induzida pela formação do complexo heparina-protamina *in vivo*, embora não inteiramente esclarecida, parece ser devida à liberação de mediadores vasoconstritores pela circulação vascular pulmonar (Hakim *et al.*, 1995; Ocal *et al.*, 2005), principalmente o tromboxano A₂ formado a partir do ácido araquidônico em células residentes do tecido pulmonar (Lowenstein, 1989; Morel *et al.*, 1988; Conzen *et al.*, 1989; Montalescot *et al.*, 1990). Além disso, estudos experimentais sugerem que a ET-1 desempenha papel importante na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina, visto que o antagonismo de receptores ET_A reduz este tipo

de hipertensão pulmonar (Freitas *et al.*, 2004). Apesar disso, ainda não é certo 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 (Stefaniszyn *et al.*, 1984; Horiguchi *et al.*, 1995). Como a protamina é utilizada como droga padrão na reversão do efeito anticoagulante da heparina em diversos tipos de cirurgias, existe grande interesse em se conhecer a fisiopatologia da hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina visando, sobretudo, melhora do tratamento.

No presente estudo, a hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina *in vivo* em cães anestesiados foi de grande magnitude e de curta duração. Concomitantemente à hipertensão pulmonar (elevação da PMAP), observamos aumento significativo do IRVP, da FC e da PcP, e uma leve redução da PAM, DC e IRVS. Embora não tenhamos explicação clara para todas as variações hemodinâmicas que acompanham a hipertensão pulmonar, podemos descartar que a queda prolongada da PAM seja consequência de redução do IRVS, visto que este parâmetro não se 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 redução do DC contribua majoritariamente para a hipotensão arterial nos cães submetidos ao complexo heparina-protamina. Uma possível explicação para a queda do DC pode ser a ação do complexo heparina-protamina diretamente no coração (efeito inotrópico negativo), causando redução temporária do fluxo no ventrículo esquerdo, diminuindo conseqüentemente o fluxo sanguíneo pulmonar. Aumento discreto da FC nos parece ser um reflexo da hipotensão sistêmica (Freitas *et al.*, 2004). A SpO₂ diminuiu durante a formação do complexo heparina-protamina na hipertensão pulmonar devido,

provavelmente, à vasoconstrição e redução do fluxo sanguíneo pulmonar causada pela formação do complexo heparina-protamina no leito vascular pulmonar.

Em nosso estudo, o BAY 41-2272 foi utilizado em dose de 10 µg/Kg/min, sob infusão contínua, de acordo com o trabalho prévio utilizando modelo de insuficiência cardíaca congestiva em cães (Boerrigter *et al.*, 2003). O uso de doses maiores não foi possível devido ao elevado custo e à quantidade limitada disponível da droga. Neste esquema de dosagem, os níveis de GMPc mostraram-se elevados, confirmando a eficácia do tratamento com o BAY 41-2272. O veículo utilizado para dissolver o BAY 41-2272 (DMSO 30%) não interferiu com as variações hemodinâmicas, permitindo a realização do estudo. Concentrações mais elevadas do BAY 41-2272 poderiam requerer uma quantidade maior do veículo, podendo interferir na hemodinâmica dos animais. Nossos resultados mostraram que o tratamento com BAY 41-2272 preveniu a hipertensão pulmonar provocada pelo complexo heparina-protamina, determinado pela diminuição da PMAP, IRVP e PcP. É provável que o BAY 41-2272 neutralize os mecanismos de vasoconstrição resultantes da interação da heparina com a protamina através de sua capacidade de ativar a guanilil ciclase solúvel via independente de NO e de aumentar os níveis de GMPc na musculatura lisa do leito vascular pulmonar. Embora improvável, não se pode descartar que parte das ações do BAY 41-2272 seja devida à sua capacidade de aumentar os níveis de AMPc na musculatura lisa. É sabido que o AMPc é um segundo mensageiro capaz de relaxar diversos tipos de músculo liso, e recentemente demonstrou-se que o BAY 41-2272 e seu precursor, YC-1, são capazes de elevar os níveis deste nucleotídeo cíclico em leucócitos (Hwang *et al.*, 2003; Thomazzi *et al.*, 2005). Entretanto, em fatias de cérebro *in vitro*, o BAY 41-2272 não alterou os níveis de AMPc (Teixeira *et al.*, 2006b). Além disso, o BAY 41-2272 causou relaxamento do músculo liso brônquico em ratos por mecanismo

independente de AMPc (Belik *et al.*, 2007) descartando que este nucleotídeo cíclico desempenhe papel importante nas ações cardiovascular do BAY 41-2272.

Quando iniciamos o presente estudo, nenhum trabalho havia sido publicado sobre as ações do BAY 41-2272 em quadros de hipertensão pulmonar, porém, nos últimos dois anos, trabalhos relataram os efeitos benéficos desta droga em outros modelos de hipertensão pulmonar. Na hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido em carneiros, demonstrou-se que o BAY 41-2272 causa potente vasodilatação pulmonar, além de aumentar a resposta vasodilatadora do NO durante o nascimento dos animais com hipertensão pulmonar crônica (Deruelle *et al.*, 2005a;b). Em modelos de hipertensão pulmonar induzida por U46619 (análogo do tromboxano A₂), o BAY 41-2272 reverteu a hipertensão pulmonar aguda em caprinos, aumentou (e prolongou) a vasodilatação pulmonar na presença de NO inalatório, mas não atenuou a hipertensão pulmonar induzida pelo U46619 com a inalação de monóxido de carbono (Evgenov *et al.*, 2004). No conjunto, estudos sugerem que o mecanismo de ação do BAY 41-2272 envolve a estimulação contínua da guanilil ciclase solúvel, produzindo conseqüentemente acúmulo de GMPc nas células da musculatura lisa vascular pulmonar. Em animais e humanos, a hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina é acompanhada de hipotensão sistêmica, que é associada ao aumento transitório da frequência cardíaca e diminuição do débito cardíaco. Embora os mecanismos destas alterações hemodinâmicas ainda não sejam claras, sugere-se que podem ser reflexo da insuficiência aguda do ventrículo direito (Shapira *et al.*, 1982; Lowenstein *et al.*, 1983; Lee & Rubin, 2005). O BAY 41-2272 exacerbou (ainda que discretamente) a hipotensão sistêmica induzida pela interação da heparina-protamina. É possível que esta potencialização de hipotensão sistêmica seja

consequência da falência cardíaca associada à redução da resistência vascular sistêmica pelo BAY 41-2272. Entretanto, há que se notar que o BAY 41-2272, administrado antes da heparina, não alterou significativamente a pressão arterial sistêmica e IRVS. A FC e o DC mostraram-se discretamente elevados com a infusão do BAY 41-2272. De modo semelhante, em modelos de insuficiência cardíaca congestiva e hipertensão pulmonar aguda em cães, o BAY 41-2272, na dose 10 µg/kg/min, também aumentou o DC e preservou a função renal dos animais (Boerrigter *et al.*, 2003). O BAY 41-2272, na dose de 0,3 mg/kg/h, elevou, o IC e causou vasodilatação pulmonar e sistêmica em carneiros (Evgenov *et al.*, 2004). A SpO₂ diminuiu durante a formação do complexo heparina-protamina, sendo esta resposta parcialmente revertida pelo tratamento com BAY 41-2272. A redução de SpO₂ durante a hipertensão pulmonar pelo complexo heparina-protamina deve refletir a vasoconstrição e redução do fluxo sanguíneo no leito vascular pulmonar, que é significativamente atenuada pelo efeito vasodilatador local do BAY 41-2272. É improvável que os efeitos protetores do BAY 41-2272 envolvam inibição da formação do complexo heparina-protamina porque esta droga foi incapaz de alterar o TTPA em plasma citratado incubado com heparina e protamina *in vitro*.

É conhecido que a hipóxia induz potente vasoconstrição pulmonar, levando ao aumento da pressão arterial pulmonar (Ghofrani *et al.*, 2004, Lee & Rubin, 2005). A hipoxemia é um fator etiológico na hipertensão pulmonar associada a doenças cardíacas, pulmonares, trombolíticas, dentre outras (Salvaterra & Rubin, 1993). A exposição a altitudes elevadas resulta na diminuição da oferta de oxigênio, levando a um quadro de hipóxia e conseqüentemente à hipertensão pulmonar (Glaus *et al.*, 2003). A hipertensão pulmonar induzida por hipóxia parece ser mediada pela ativação de receptores ET_A de ET-1

(Soma *et al.*, 1999). Estudos recentes sugerem a participação do peptídeo natriurético atrial (PNA) na regulação da pressão arterial pulmonar e na remodelação vascular pulmonar em resposta ao stress por hipóxia (Chen *et al.*, 2006). Evidências experimentais sugerem que curtos períodos de hipóxia na fase fetal e pós-natal leva à redução do fluxo pulmonar, acentuando a hipoxemia, contribuindo deste modo para o quadro de hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (Dick *et al.*, 1981; Rabinovitch, 2001).

Em nosso estudo, observamos que a instalação da hipóxia em cães anestesiados leva a um aumento significativo da PMAP, juntamente com IRVP e PcP, caracterizando deste modo a hipertensão pulmonar. Houve ainda redução da SpO₂, decorrente da vasoconstrição pulmonar em resposta à hipóxia. O IRVS apresentou discreta tendência a diminuição, ao passo que os outros parâmetros hemodinâmicos não foram alterados.

O tratamento com o BAY 41-2272 reduziu os aumentos de PMAP, IRVP e PcP nos animais sob hipóxia, provavelmente devido à vasodilatação induzida por esta droga. Apesar de o BAY 41-2272 não alterar significativamente a PAM, observamos significante vasodilatação sistêmica, constatada pela queda do IRVS. Estas alterações hemodinâmicas causadas pelo BAY 41-2272 são, possivelmente, decorrentes da vasodilatação sistêmica e pulmonar induzidas pelo acúmulo de GMPc na célula muscular lisa. A FC e o IC também aumentaram em resposta ao BAY 41-2272, de modo similar ao nosso modelo de hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina e em outros estudos de hipertensão pulmonar (Boerrigter *et al.*, 2003; Evgenov *et al.*, 2004), sendo este aumento devido provavelmente à vasodilatação sistêmica induzida pelo BAY 41-2272. Observamos também que a redução da SpO₂ durante a hipóxia foi parcialmente restabelecida pelo BAY 41-2272 como reflexo da normalização do fluxo sanguíneo pulmonar.

O tratamento da hipertensão pulmonar com agentes vasodilatadores orais ou intravenosos como drogas doadoras de NO, estimuladores ou ativadores da guanilil ciclase solúvel é freqüentemente associado com hipotensão arterial e piora da oxigenação arterial devido a má combinação da ventilação-perfusão pulmonar (Evgenov *et al.*, 2004). Estudos em ratos mostraram que o BAY 41-2272 preveniu a hipertrofia cardíaca e a fibrose induzidas pelo bloqueio crônico de NO (Zanfolin *et al.*, 2006).

A vasodilatação pulmonar seletiva com inalação de NO em humanos foi apresentada como uma boa estratégia farmacológica para reduzir a hipertensão pulmonar sem produzir vasodilatação sistêmica (Pepke-Zaba *et al.*, 1991; Frostell *et al.*, 1991; Hayward *et al.*, 2001). A inalação de agentes vasodilatadores pode evitar efeitos colaterais sistêmicos e, de fato, estudo recente mostrou que inalação de micropartículas contendo BAY 41-2272, BAY 41-8543 ou BAY 58-2667 produz potente e seletiva vasodilatação pulmonar em cordeiros com hipertensão pulmonar aguda (Evgenov *et al.*, 2006). Além disso, estes estudos pré-clínicos apontam que estimuladores ou ativadores da guanilil ciclase solúvel, combinados com NO exógeno, podem ser eficazes no tratamento da hipertensão pulmonar, especialmente quando a sinalização endógena da via guanilil ciclase solúvel dependente de NO está comprometida. Atualmente, o BAY 41-2272, juntamente com o BAY 63-2521 e BAY 41-8543, estão em testes clínicos para tratamento de pacientes com hipertensão pulmonar crônica (Austin, 2006; Evgenov *et al.*, 2006).

CONCLUSÃO

Na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina, a infusão com BAY 41-2272 (10 µg/kg/min) reduziu significativamente o aumento da PMAP, IRVP e PcP. A redução da SpO₂ foi também significativamente atenuada pelo BAY 41-2272.

Na hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina, o BAY 41-2272 não modificou as variações da PAM, FC e IC; entretanto, diminuiu significativamente o IRVS;

Na hipertensão pulmonar induzida pela hipóxia, o BAY 41-2272 reduziu marcadamente o aumento da PMAP, IRVP e PcP. A redução da SpO₂ foi também significativamente atenuada pelo BAY 41-2272;

Na hipertensão pulmonar induzida pela hipóxia, o BAY 41-2272 não modificou as variações da PAM, FC e IC; entretanto, diminuiu significativamente o IRVS;

O tratamento com BAY 41-2272 elevou significativamente os níveis plasmáticos de GMPc tanto nos animais submetidos à hipertensão pulmonar induzida pelo complexo heparina-protamina como pela hipóxia.

Em plasma de cão citratado in vitro, a protamina reverteu o aumento de TTPA produzido pela heparina. A incubação prévia com BAY 41-2272 não modificou o TTPA;

No conjunto, nossos resultados mostram que o BAY 41-2272 reduz a hipertensão pulmonar nos dois modelos estudados, indicando que se trata de droga promissora para tratamento desta desordem. É provável que o mecanismo de ação do BAY 41-2272 seja devido à estimulação contínua da guanilil ciclase solúvel e consequentemente acúmulo de GMPc na musculatura vascular pulmonar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adatia I; Thompson J; Landzberg M; Wessel DL. Inhaled nitric oxide in chronic obstructive lung disease. *Lancet* 1993; 341: 307-8.

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Mikanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-2.

Austin, S. Drug discovery technology Europe 2006. IBC's Tenth Annual Conference and Exhibition. *IDrugs* 9: 256-60.

Badesch DB, McLaughlin VV, Delcroix M, Vizza CD, Olschewski H, Sitbon O, et al. Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 56S-61S.

Badesch DB, Tapson VF, Mcgoon MD, Brundage BH, Rubin LJ, Wigley FM, et al. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 2000; 132(6): 425-34.

Barakat JS, Teixeira CE, Okuyama CE, Priviero FB, Faro R, Antunes E, et al. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 2003; 477(2):163-9.

Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269–80.

Barnes PJ. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 515–48.

Barnes PJ. New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 217–22.

Barreto AC, Franchi SM, Castro CR, Lopes AA. One-year follow-up of the effects of sildenafil on pulmonary arterial hypertension and veno-occlusive disease. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(2): 185-95.

Barst RJ, Mcgoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, et al. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 40S-7S.

Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, Mcgoon MD, Rich S, Badesch DB, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334(5): 296-302.

Barst RJ. Long-term prostacyclin reduces pulmonary vascular resistance in severe primary pulmonary hypertension. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16(3): 253-4.

Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Gerzer R, Minuth T, Pleibeta U, et al. NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272. *BMC Pharmacol* 2001; 1: 13-24.

Belik J, Hehne N, Pan J, Behrends S. Soluble guanylate cyclase-dependent relaxation is reduced in the adult rat bronchial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292(3):L699-703.

Bialecki RA, Fisher CS, Murdoch WW, Barthlow HG. Chronic hypoxia increases staurosporine sensitivity of pulmonary artery smooth muscle to endothelin-1. *Pulm Pharmacol Ther* 1998; 11: 159-63.

Bischoff E, Schramm M, Straub A, Feurer A, Stasch JP. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. *Urology* 2003; 61(2): 464-7.

Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A, Tsuruda T, Harty GJ, Lapp H, et al. Cardiorenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. *Circulation* 2003; 107: 686-9.

Brioni JD, Nakane M, Hsieh GC, Moreland RB, Kolasa T, Sullivan JP. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2002; 14(1): 8-14.

Buechler WA, Nakane M & Murad F. Expression of soluble guanylate cyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 351-7.

Carr JA, Silverman N: The heparin-protamine interaction: A review. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1999; 40: 659–66.

Carteaux JP, Roux S, Siaghy M, Schjoth B, Dolofon P, Bechamps Y, et al. Acute pulmonary hypertension after cardiopulmonary bypass in pig: The role of endogenous endothelin. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 15: 346-52.

Cellek S. The rho-kinase inhibitor Y-27632 and the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 relax rabbit vaginal wall and clitoral corpus cavernosum. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 287-90.

Chang SW, Voelkel NF. Charge-related lung microvascular injury. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(2): 534-45.

Channick RN, Sitbon O, Barst RJ, Manes A, Rubin LJ. Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 62S-7S.

Chargaff E, Olson KB. 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* 1937; 122: 153-67.

Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Dicarlo VS, Oparil S. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1995; 79(6): 2122-31.

Chen YF, Feng JA, Li P, Xing D, Ambalavanan N, Oparil S. Atrial natriuretic peptide-dependent modulation of hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *Life Sci* 2006; 79(14): 1357-65.

Chockalingam A, Gnanavelu G, Venkatesan S, Elangovan S, Jagannathan V, Subramaniam T, et al. Efficacy and optimal dose of sildenafil in primary pulmonary hypertension. *Int J Cardiol* 2005; 99(1): 91-5.

Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* 1992; 85: 504-9.

Collier J, Vallance P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10(11): 427-31.

Comunale ME, Maslow A, Robertson LK, Haering JM, Mashikian JS, Lowenstein E. Effect of site venous protamine administration, previously alleged risk factors, and preoperative use of aspirin on acute protamine-induced pulmonary vasoconstriction. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2003; 17(3): 309-13.

Conzen PF, Habazettl H, Gutmann R, Hobbhahn J, Goetz AE, Peter K, et al. Thromboxane mediation of pulmonary hemodynamic responses after neutralization of heparin by protamine in pigs. *Anesth Analg* 1989; 68: 25-31.

Cremona G, Dinh Xuan AT, Higenbottam TW. Endothelium derived relaxing factor and the pulmonary circulation. *Lung* 1991; 169: 185-202.

D'alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115: 343-9.

De Nucci G, Gryglewski RG, Warner TD, Vane JR. The receptor-mediated release of EDRF and PGI₂ from bovine aortic cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2334-8.

Degges RD, Foster ME, Dang AQ, Read RC. Pulmonary hypertensive effect of heparin and protamine interaction: Evidence for thromboxane B₂ release from the lung. *Am J Surg* 1987;154: 696-9.

Deruelle P, Balasubramaniam V, Kunig AM, Seedorf GJ, Markham NE, Abman SH. BAY 41-2272, a direct activator of soluble guanylate cyclase, reduces right ventricular hypertrophy and prevents pulmonary vascular remodeling during chronic hypoxia in neonatal rats. *Biol Neonate* 2006; 90(2): 135-44.

Deruelle P, Grover TR, Abman SH. Pulmonary vascular effects of nitric oxide-cGMP augmentation in a model of chronic pulmonary hypertension in fetal and neonatal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio*. 2005b; 289(5): L798-806.

Deruelle P, Grover TR, Storme L, Abman SH. Effects of BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase activator, on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005a; 288(4): L727-33.

Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T, da Rocha JB, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth Analg* 2005; 101(1): 115-20.

Dick M 2nd, Heidelberger K, Crowley D, Rosenthal A, Hees P. Quantitative morphometric analysis of the pulmonary arteries in two patients with D-transposition of the great arteries and persistence of the fetal circulation. *Pediatr Res* 1981; 15(11): 1397-401.

Dinh Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1539-47.

Doyle AE. The Australian national blood pressure study. *Aust Fam Physician* 1981; 10: 558-9.

Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, et al. Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* 2006; 113(2): 286-95.

Evgenov OV, Ichinose F, Evgenov NV, Gnoth MJ, Falkowski GE, Chang Y, et al. Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs. *Circulation* 2004; 110(15): 2253-9.

Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(9): 755-68.

Fagan JM, Rex SE, Hayes-Licitra SA, Waxman L. L-arginine reduces right heart hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 254: 100-3.

Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004; 351(16): 1655-65.

Faro R, Grassi-Kassisse DM, Donato JL, Boin I, Opgenorth TJ, Withrington PG. Role of Endothelin ET_A and ET_B receptors in the arterial vasculature of the isolated canine liver. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26: S204-7.

Franco-Cereceda A, Holm P, Brodin LA, Liska J, Larsen FF. ET-1 infusion increases systemic vascular resistance and depresses cardiac output in patients with chronic hypoxaemia and pulmonary hypertension. *Scand Cardiovasc J* 1999; 33: 151-6.

Frank H, Mlczoch J, Huber K, Schuster E, Gurtner HP, Kneussl M. The effect of anticoagulant therapy in primary and anorectic drug-induced pulmonary hypertension. *Chest*. 1997; 112(3): 714-21.

Fratacci MD, 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* 1992; 145 (abstr.): A722.

Fratacci MD, Frostell CG, Chen T-Y, Wain JC JR, Robinson DR, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep. *Anesthesiology* 1991; 75: 990-9.

Freitas CF, Faro R, Dragosavac D, Clozel M, De Nucci G, Antunes E. Role of endothelin-1 and thromboxane A₂ in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine interaction in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43(1): 106-12.

Frostell C, Fratacci MD, Wain JC, Jones R, Zapol WM. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; 83(6): 2038-47. Erratum in: *Circulation* 1991; 84(5): 2212.

Frostell CG, Blomqvist H, Hedenstierna G, Lundberg J, Zapol WM. Inhaled nitric oxide selective reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. *Anesthesiology* 1993; 78: 427-35.

Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Vizza CD, Kneussl M, Manes A, et al. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(9): 1496-502.

Galie N, Seeger W, Naeije R, Simonneau G, Rubin LJ. Comparative analysis of clinical trials and evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 81S-8S.

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*. 1971; 27(4): 392-6.

Gattinoni L, Pesenti A, Bombino M. Relationships between lung computed tomographic density, gas exchange, and PEEP in acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1988; 69: 824-32.

Gerzer R, Radany EW, Garbers DL. The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 108: 678-86.

Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, et al. Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Ann Intern Med* 2004; 141(3): 169-77.

Glaus TM, Hassig M, Baumgartner C, Reusch CE. Pulmonary hypertension induced in dogs by hypoxia at different high-altitude levels. *Vet Res Commun* 2003; 27(8): 661-70.

Goldie RG, Knott PG, Carr MJ, Hay DWP, Henry PJ. The endothelins in the pulmonary system. *Pulmon Pharmacol* 1996; 9: 69-93.

Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. *Drugs* 1992; 43(6): 889-924.

Grassi-Kassisse DM, Faro R, Witrington PG, Zatz R, Opgenorth TJ, Antunes E, et al. Characterisation of functional endothelin receptors in canine isolated perfused spleen. *Eur J Pharmacol* 1995; 282: 57-63.

Hagedorn HC, Jensen BN, Krarup NB, Wodstrup I. Landmark article Jan 18, 1936: Protamine insulinate. By H.C. Hagedorn, B.N. Jensen, N.B. Krarup, & I. Wodstrup. *JAMA* 1984; 251(3): 389-92.

Hakim TS, Picone A, Oleary CE, Camporesi EM. Protamine-induced pulmonary venoconstriction in heparinized pigs. *Anesth Analg* 1995; 81(1): 38-43.

Harteneck C, Koesling D, Soling A, Schultz G, Bohme E. Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett* 1990; 272 (1-2): 221-3.

Hay DWP. Endothelin-1: An interesting peptide or an important mediator in pulmonary diseases. *Pulm Pharmacol Therap* 1998; 11: 141-6.

Hayward CS, Macdonald PS, Keogh AM. Inhaled nitric oxide in cardiology. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; 10(11): 1947-56.

Hemsén A. Biochemical and functional characterisation of endothelin peptides with special reference to vascular effects. *Acta Physiol Scand Suppl* 1991; 602: 1-61.

Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 484-91.

Holm P, Liska J, Franco-Cereceda A. The ETA receptor antagonist, BMS-182874 reduces acute hypoxic pulmonary hypertension in pigs in vivo. *Cardiovasc Res* 1998; 37: 765-71.

Horiguchi T, Enzan K, Mitsuhata H, Murata M, Suzuki M. Heparin-protamine complexes cause pulmonary hypertension in goats. *Anesthesiology* 1995; 83: 786-91.

Horowitz JC. Protamine: A review of its toxicity. *Anesth Analg* 1985; 64: 348-61.

Humbert M, Kiely DG, Carlsen J, Lierop CV, Hoeper M. Long-term safety profile of bosentan in patients with pulmonary arterial hypertension: results from European Surveillance Program. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2: A300.

Hwang TL, Hung HW, Kao SH, Teng CM, Wu CC, Cheng SJ. Soluble guanylyl cyclase activator YC-1 inhibits human neutrophil functions through a cGMP-independent but cAMP-dependent pathway. *Mol Pharmacol*. 2003; 64(6): 1419-27.

Ichinose F, Roberts JD JR, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator: current uses and therapeutic potential. *Circulation* 2004; 109(25): 3106-11.

Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 1982; 718: 49-59.

Ivy DD, Parker TA, Ziegler JW, Galan HL, Kinsella JP, Tudor RM, et al. Prolonged endothelin A receptor blockade attenuates chronic pulmonary hypertension in the ovine fetus. *J Clin Invest* 1997; 99(6): 1179-86.

Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 1-20.

Kalsi JS, Bahadur G, Muneer A, Ozturk O, Christopher N, Ralph DJ, et al. Novel PDE5 inhibitors for the treatment of male erectile dysfunction. *Reprod Biomed Online*. 2003; 7: 456-61.

Kimmel SE, Sekeres MA, Berlin JA, Ellison N, Disesa VJ, Strom B L. Risk factors for clinically important adverse events after protamine administration following cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Cardiol* 1998b; 32(7): 1916-22.

Kimmel SE, Sekeres MA, Berlin JA, Goldberg LR, Strom BL. Adverse events after protamine administration in patients undergoing cardiopulmonary bypass: Risks and predictors of under-reporting. *J Clin Epidemiol* 1998a; 51: 1–10.

Ko FN, Wu CC, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase. *Blood* 1994; 84: 4226-33.

Krause W, Kraus T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prostacyclin analogue iloprost in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 30(1): 61-8.

Lee SH, Rubin LJ. Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *J Intern Med* 2005; 258(3): 199-215.

Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2006; 367(9524): 1747-57.

Lowenstein E, Johnston WE, Lappas DG, D'Ambra MN, Schneider RC, Daggett WM, et al. Catastrophic pulmonary vasoconstriction associated with protamine reversal of heparin. *Anesthesiology* 1983; 59: 470-3.

Lowenstein E, Lynch K, Robinson DR, Fitzgibbon CM, Zapol W. Incidence, severity and causation of adverse cardiopulmonary response to protamine reversal of heparin anticoagulation in man. *Am Rev Respir Dis* 1988; 137(suppl): 245.

Lowenstein E. Lessons from studying an infrequent event: Adverse hemodynamic response associated with protamine reversal of heparin anticoagulation. *J Cardiothorac Anesth* 1989; 3: 99-107.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 375-414.

Machado RF, Londhe Nerkar MV, Dweik RA, Hammel J, Janocha A, Pyle J, et al. Nitric oxide and pulmonary arterial pressures in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(7): 1010-7.

Maclean RM. Endothelin-1: a mediator of pulmonary hypertension? *Pulmon Pharmacol Therap* 1998; 11: 125-32.

Marciniak SJ, Plumpton C, Barker PJ, Huskisson NS, Davenport AP. Localization of immunoreactive endothelin and proendothelin in the human lung. *Pulm Pharmacol* 1992; 5: 175-82.

Martin E, Lee YC, Murad F. YC-1 activation of human soluble guanylyl cyclase has both heme-dependent and heme-independent components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12938-42.

Mcgoon M, Gutterman D, Steen V, Barst R, Mccrory DC, Fortin TA, et al. Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126(1 Suppl): 14S-34S.

Mclaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation* 2002; 106(12): 1477-82.

Michael JR, Kennedy TP, Buescher P, Farrukh I, Lodato R, Rock PC, et al. Nitrendipine attenuates the pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy caused by intermittent hypoxia in rats. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133(3): 375-9.

Michelakis E, Tymchak W, Lien D, Webster L, Hashimoto K, Archer S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. *Circulation* 2002; 105(20): 2398-403.

Montalescot G, Lowenstein E, Ogletree ML, Greene EM, Robinson DR, Hartl K, et al. Thromboxane receptor blockade prevents pulmonary hypertension induced by heparin-protamine reactions in awake sheep. *Circulation* 1990; 82: 1765-77.

Morel PR, Lowenstein E, Nguyenduy T, Robinson DR, Repine JE, Chenoweth DE, et al. 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* 1988; 62: 905-15.

Murali S. Pulmonary arterial hypertension. *Curr Opin Crit Care*. 2006; 12(3): 228-34.

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* 1999; 276: L358-64.

Navin DM, Gross NJ. Management of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 1996; 2: 141-7.

Nguyen QT, Colombo F, Rouleau JL, Dupuis J, Calderone A. LU135252, an endothelin (A) receptor antagonist did not prevent pulmonary vascular remodelling or lung fibrosis in a rat model of myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 2000; 130(7): 1525-30.

Ocal A, Kiris I, Erdinc M, Peker O, Yavuz T, Ibrisim E. Efficiency of prostacyclin in the treatment of protamine-mediated right ventricular failure and acute pulmonary hypertension 2005; 207: 51-8.

Ohlstein EH, Wood KS, Ignarro LJ. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch Biochem Biophys* 1982; 218: 187-98.

Olschewski H, Rohde B, Behr J, Ewert R, Gessler T, Ghofrani HA, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inhaled iloprost, aerosolized by three different devices, in severe pulmonary hypertension. *Chest* 2003; 124(4): 1294-304.

Olschewski H, Rose F, Schermuly R, Ghofrani HA, Enke B, Olschewski A, et al. Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 2004; 102(2): 139-53.

Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338: 1173-4.

Pietra GG, Rubin Lj, Rich S (1997). The pathology of primary pulmonary hypertension. In: Primary pulmonary Hypertension Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, 1997; 19-61.

Priviero FB, Baracat JS, Teixeira CE, Claudino MA, De Nucci G, Antunes E. Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(9): 728-34.

Rabinovitch M. Pathology of pulmonary hypertension. *Prog Pediatr Cardiol* 2001; 12: 223-47.

Rae GA, Trybulec M, De Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 releases eicosanoids from the rabbit isolated perfused kidney and spleen. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: S89-92.

Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat toracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983; 52: 352-7.

Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre Km, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 1987; 107(2): 216-23.

Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327(2): 76-81.

Rich S, Seidlitz M, Dodin E, Osimani D, Judd D, Genthner D, et al. The short-term effects of digoxin in patients with right ventricular dysfunction from pulmonary hypertension. *Chest*. 1998; 114(3): 787-92.

Rich S. The current treatment of pulmonary arterial hypertension: time to redefine success. *Chest*. 2006; 130(4): 1198-202.

Roberts DH, Lepore JJ, Maroo A, Semigran MJ, Ginns LC. Oxygen therapy improves cardiac index and pulmonary vascular resistance in patients with pulmonary hypertension. *Chest* 2001; 120: 1547-55.

Roberts JD JR, Chiche JD, Weimann J, Steudel W, Zapol WM, Bloch KD. Nitric oxide inhalation decreases pulmonary artery remodeling in the injured lungs of rat pups. *Circ Res* 2000; 87(2): 140-5.

Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galie N, Black CM, Keogh A, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346(12): 896-903. Erratum in: *N Engl J Med* 2002; 346(16): 1258.

Rubin LJ, Galie N. Pulmonary arterial hypertension: a look to the future. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 89S-90S.

Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, Mcgoon M, Barst R, Williams WB, et al. Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med* 1990; 112(7): 485-91.

Salvaterra CG, Rubin LJ. Investigation and management of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 1414-7.

Sanchez O, Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases. *Thorax*. 1999; 54(3): 273-7.

Schapira M, Christman W. Neutralization of heparin by protamine. Time for a change? *Circulation* 1990; 82: 1877-9.

Shapira N, Schaff HV, Piehler JM, White RD, Still JC, Pluth JR. Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1982; 84(4): 505-14.

Sibbald WJ, Driedger AA, Myers ML, Short AI, Wells GA. Biventricular function in the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1983; 84: 126-34.

Sitbon O, Humbert M, Nunes H, Parent F, Garcia G, Herve P, et al. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40(4): 780-8.

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* 1999; 20: 620-30.

Stafford-Smith M, Lefrak EA, Qazi AG, Welsby IJ, Barber L, Hoeft A, et al. Efficacy and Safety of Heparinase I versus Protamine in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with and without Cardiopulmonary Bypass *Anesthesiology* 2005; 103: 229–40

Stasch JP, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Minuth T, et al. Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 2002a; 135: 333-43.

Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; 410: 212-5.

Stasch JP, Schmidt P, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Haerter M, et al. NO- and haem-independent activation of soluble guanylyl cyclase: molecular basis and cardiovascular implications of a new pharmacological principle. *Br J Pharmacol* 2002b; 136(5): 773-83.

Staub NC., Pulmonary intravascular macrophages. *Chest* 1988; 93(3 suppl): 84S-5S.

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* 1984; 87: 678-86.

Stenmark KR, Stenmark KR, Fasules J, Hyde DM, Voelkel NF, Henson J, et al. Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4300 m. *J Appl Physiol* 1987; 62: 821-30.

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* 1991a; 18: 38-43.

Stocker C, Penny DJ, Brizard CP, Cochrane AD, Soto R, Shekerdemian LS. Intravenous sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomised trial in infants after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2003; 29(11): 1996-2003.

Stone JR, Marletta MA. Synergistic activation of soluble guanylate cyclase by YC-1 and carbon monoxide: implications for the role of cleavage of the iron-histidine bond during activation by nitric oxide. *Chem Biol* 1998; 5: 255-61.

Straub A, Benet-Buckholz J, Frode R, Kern A, Kohlsdorfer C, Schmitt P, Schwarz T, et al. Metabolites of orally active NO-independent pyrazolopyridine stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg Med Chem* 2002; 10(6): 1711-7.

Takahashi T, Kanda T, Imai S, Suzuki T, Kobayashi I, Nagai R. Amlodipine inhibits the development of right ventricular hypertrophy and medial thickening of pulmonary arteries in a rat model of pulmonary hypertension. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; 91(1):17-32.

Takai M, Umemura I, Yamasaki K, Watakabe T, Fujitani Y, Oda K, et al. A potent and specific agonist, Suc-[Glu⁹,Ala¹¹,15]-endothelin-1 (8-21), IRL 1620, for the ET_B receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 953-9.

Teixeira CE, Priviero FB, Claudino MA, Baracat JS, De Nucci G, Webb RC, et al. Stimulation of soluble guanylyl cyclase by BAY 41-2272 relaxes anococcygeus muscle: interaction with nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 2006a; 530(1-2): 157-65.

Teixeira CE, Priviero FB, Todd J Jr, Webb RC. Vasorelaxing effect of BAY 41-2272 in rat basilar artery: involvement of cGMP-dependent and independent mechanisms. *Hypertension*. 2006b; 47(3):596-602.

Thomazzi SM, Moreira J, De Nucci G, Antunes E. Inhibitory effects on human eosinophil chemotaxis in vitro by BAY 41-2272, an activator of nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase. *Biochem Pharmacol*. 2005; 69(6): 875-82.

Traylor TG, Sharma VS. Why NO? *Biochemistry* 1992; 31: 2847-9.

Underwood DC, Bochnowicz S, Osborn RR, Luttmann MA, Loudon CS, Hart JK, et al. Effects of SB 217242 on hypoxia-induced cardiopulmonary changes in the high altitude-sensitive rat. *Pulm Pharmacol Ther* 1999; 12: 13-26.

Voelkel N. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133:1186-95.

Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 1987; 39: 163-6.

Wanstall JC, Jeffery TK. Recognition and management of pulmonary hypertension. *Drugs* 1998; 56: 989-1007.

Warner AE, Barry BE, Brain JD. Pulmonary intravascular macrophages in sheep. Morphology and function of a novel constituent of the mononuclear phagocyte system. *Lab. Invest.* 1986; 55: 276-88.

Warner TD, De Nucci G, Vane JR. Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 159: 325-326, 1989a.

Weinberger B, Laskin dl, Heck DE, Laskin JD. The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol Sci* 2001; 59(1): 5-16.

Weir EK, Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J* 1995; 9:183-9.

Welsby IJ, Newman MF, Phillips-Bute B, Messier RH, Kakkis ED, Stafford-Smith M. Hemodynamic changes after protamine administration: association with mortality after coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* 2005; 102: 308-14.

Wilkens H, Guth A, Konig J, Forestier N, Cremers B, Hennen B, et al. Effect of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation.* 2001; 104(11): 1218-22.

Withrington PG, De Nucci G, Vane JR. Endothelin-1 causes vasoconstriction and vasodilatation in blood perfused liver of the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 13: S209-10,.

Wohlfart P, Malinski T, Ruetten H, Schindler U, Linz W, Schoenafinger K, et al. Release of nitric oxide from endothelial cells stimulated by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol* 1999; 128: 1316-22.

Wu CC, Ko FN, Kuo SC, Lee FY, Teng CM. YC-1 inhibited human platelet aggregation through NO-independent activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 1973-8.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-5.

Zanfolin M, Faro R, Araujo EG, Guaraldo AM, Antunes E, De Nucci G. Protective effects of BAY 41-2272 (sGC stimulator) on hypertension, heart, and cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic L-NAME treatment in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47(3): 391-5.

Zapol WM, Snider MT. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med* 1977; 296: 476-80.

ANEXOS

Anexo 1 Cópia do certificado submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética na Experimentação Animal – CEEA – IB – UNICAMP.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

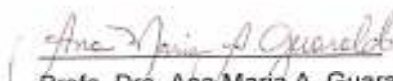
Certificamos que o Protocolo nº 595-1, sobre "HIPERTENSÃO PULMONAR NEUROGÊNICA EM CÃES ANESTESIADOS: O PAPEL DA ENDOTELINA -1, ÓXIDO NÍTRICO E TROMBOXANO A2", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Cristiane Fonseca Freitas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03 de outubro de 2003.

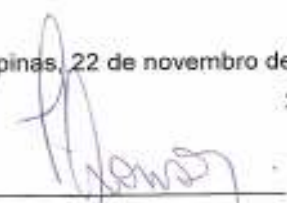
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 595-1, entitled "NEUROGENIC PULMONARY HYPERTENSION IN ANAESTHETIZED DOGS: THE ROLE OF ENDOTHELIN -1, NITRIC OXIDE AND THROMBOXANE A2", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 3, 2003.

Campinas, 22 de novembro de 2006.

2ª. VIA


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3788-6359
Telefax: (19) 3788-6356
E-mail: ceea@cemb.unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

Anexo 2

EFFECT OF BAY 41-2272 IN THE PULMONARY HYPERTENSION INDUCED BY HEPARIN-PROTAMINE COMPLEX IN ANAESTHETIZED DOGS

Cristiane F Freitas,* Rafael P Morganti,[†] Joyce M Annichino-Bizzacchi,[‡] Gilberto De Nucci[†] and Edson Antunes[†]

*Departments of Basic Biological Sciences and Veterinary Hospital, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Poços de Caldas, and Departments of [†]Pharmacology and [‡]Hematology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, Brazil

SUMMARY

1. BAY 41-2272 is a potent activator of the nitric oxide-independent site of soluble guanylate cyclase and has been recently introduced as a new therapeutic agent to treat chronic pulmonary hypertension (PH) in neonatal sheep. Because the *in vivo* heparin-protamine interaction may lead to severe PH, the aim of the present study was to evaluate the effects of BAY 41-2272 in the PH induced by heparin-protamine interaction in anaesthetized dogs.

2. Sixteen male dogs (10 mongrel dogs and six Beagles) were anaesthetized and instrumented for acquisition of mean arterial blood pressure (MABP), mean pulmonary arterial pressure (MPAP), heart rate (HR), pulmonary capillary wedge pressure (PCWP), cardiac index (CI) and indices of systemic and pulmonary vascular resistance (ISVR and IPVR, respectively). Plasma cGMP levels and S_{pO_2} were evaluated.

3. Intravenous administration of heparin (500 IU/kg) followed 3 min later by protamine (10 mg/kg) caused marked PH, as evaluated by the increase in MPAP, PCWP and IPVR. This was accompanied by a significant fall in MABP and a transient increase in HR. Infusion of BAY 41-2272 (10 μ g/kg per h, starting 10 min before heparin administration) augmented plasma cGMP levels and slightly and significantly increased HR and CI, without affecting the other cardiovascular parameters. The elevation in IPVR, MPAP and PCWP triggered by the heparin-protamine interaction was significantly reduced in animals exposed to BAY 41-2272.

4. In vehicle-treated dogs, the S_{pO_2} values decreased significantly at the peak of the PH and this was significantly attenuated by treatment with BAY 41-2272. In addition, BAY 41-2272 (10 μ mol/L) had no effect on the activated partial thromboplastin time of citrated plasma after the addition of heparin-protamine.

5. In conclusion, BAY 41-2272 was effective in reducing canine PH induced *in vivo* by the heparin-protamine interaction, thus indicating its potential in the treatment of this type of disorder.

Key words: BAY 41-2272, cGMP, heparin, protamine, pulmonary hypertension.

INTRODUCTION

Soluble guanylate cyclase (sGC) is well known as the principal intracellular receptor for nitric oxide (NO), facilitating the formation of the intracellular second messenger cGMP, which, in turn, regulates different cellular functions via interactions with specific kinases, ion channels and phosphodiesterases.¹ The compound BAY 41-2272 (5-cyclopropyl-2-[1-(2-fluoro-benzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]-pyrimidin-4-ylamine) has been shown to potently stimulate sGC,² causing vascular smooth muscle relaxation *in vitro*^{3–6} and a reduction of arterial blood pressure in normal and hypertensive rats.^{2,7} Recently, BAY 41-2272 was shown to potently reduce the pulmonary hypertension (PH) induced by the thromboxane analogue U46619 in awake lambs.⁸ Moreover, in ovine fetus and persistent PH of newborn sheep, BAY 41-2272 caused sustained pulmonary vasodilation and a reduction in pulmonary vascular resistance, as well as augmenting the pulmonary vasodilation caused by inhaled NO.^{9,10}

Pulmonary hypertension is a common sequel to several respiratory and cardiovascular diseases in humans. It is characterized by abnormal pulmonary vasoconstriction and alterations in pulmonary vascular structures (vascular remodelling), both of which contribute to the elevations in pulmonary artery pressure and pulmonary vascular resistance.¹¹ Heparin reversal by the polycationic polypeptide protamine is widely used because heparin anticoagulation is necessary for a number of clinical procedures and circulating heparin must be neutralized at the end of the procedure to reduce the risk of haemorrhage.¹² However, a major complication of the *in vivo* heparin-protamine interaction is the occurrence of PH, which may be associated with increased mortality rate.^{13,14} The increased arterial pulmonary pressure has been suggested to reflect the local release of vasoconstrictor mediators when heparin-protamine complexes pass through the pulmonary vascular bed, but this mechanism remains unclear.¹⁵ Therefore, studies focusing on novel drugs to treat PH as consequence of the *in vivo* heparin-protamine interaction are of potential interest. The purpose of the present study was to evaluate the effects of BAY 41-2272 in PH, as well as on other

Correspondence: Dr Edson Antunes, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, PO Box 6111, 13081-970, Campinas (SP), Brazil. Email: edson.antunes@uol.com.br

Received 6 December 2005; revision 16 May 2006; accepted 5 June 2006.

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

haemodynamic alterations induced by the heparin-protamine interaction in anaesthetized dogs.

METHODS

Animals and experimental procedure

The experimental protocols were approved by the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). Six male beagles and 10 mongrel dogs provided by Multidisciplinary Center for Biologic Research (CEMIB-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil), weighing 10.7 ± 0.7 kg were anaesthetized with pentobarbital sodium (Hypnol[®]; Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil; 30 mg/kg, i.v.), intubated and ventilated artificially (Harvard Apparatus Dual Phase Control Respirator, Holliston, MA, USA). The level of anaesthesia was maintained using a combination of fentanyl citrate (0.01 mg/kg per h) and diazepam (0.25 mg/kg per h). Respiratory rate and tidal volume were maintained at 20 breaths/min and 13 mL/kg bodyweight, respectively. In order to measure arterial oxygen saturation (S_{aO_2}), a pulse oximeter connected to a sensor for transcutaneous monitoring of S_{aO_2} was implanted in the animals' tongues (EMAI Model OX-P-10; Transmai, São Paulo, Brazil).

The left femoral artery and vein were cannulated for measurement of mean arterial blood pressure (MABP) using a pressure transducer (MX-860; Medex, Columbus, OH, USA) and for drug administration, respectively. A 7 Fr Swan-Ganz thermodilution catheter (Edwards Laboratories, Santa Ana, CA, USA) was introduced through the right femoral vein and advanced into the pulmonary artery. This catheter was connected to an appropriate pressure transducer (MX-860; Medex) to measure pulmonary arterial pressure (PAP), right atrial pressure (RAP) and pulmonary capillary wedge pressure (PCWP). Cardiac output (CO) was measured in duplicate by the thermodilution technique. Heart rate (HR) was also monitored using a continuous surface electrocardiogram (lead I). The haemodynamic parameters were visualized on a computer monitor throughout the experiment and events were recorded on a printer coupled to this system (SDM 2000; Dixtal, São Paulo, Brazil). Haemodynamic parameters were allowed to stabilize for 30 min prior to any injections or infusions.

Systemic vascular resistance (SVR) and pulmonary vascular resistance (PVR) were calculated using the following formulae:

$$SVR = (MABP - RAP) / CO \times 80$$

$$PVR = (MPAP - PCWP) / CO \times 80$$

where MPAP is mean pulmonary arterial pressure and 80 is a constant that converts mmHg/L per min to dyn.s/cm⁵. Systemic vascular resistance, PVR and CO were expressed as indices representing values corrected for body surface area (BSA; expressed in m²) and are presented as an index of systemic vascular resistance (ISVR), an index of pulmonary vascular resistance (IPVR) and cardiac index (CI), respectively. They were calculated as follows:

$$BSA = 0.20247 \times \text{Height}^{0.725} \times \text{Weight}^{0.425}$$

where height (in m) was defined as the distance from the upper lip to the anus with the animal in a supine position. Weight was measured in kg.

$$ISVR = SVR \times BSA$$

$$IPVR = PVR \times BSA$$

$$CI = CO / BSA$$

Experimental design and drug treatments

Animals were anaesthetized as described above and all basal haemodynamic parameters were determined after 30 min stabilization. Next, heparin (500 IU/kg, bolus) was injected intravenously and the haemodynamic variables

were determined every minute. Three minutes later, protamine (10 mg/kg) was administered intravenously as bolus injection. Haemodynamic measurements were again obtained every minute during the first 5 min and the 10 and 15 min after protamine administration ($n = 8$). In a separate group, BAY 41-2272 was administered intravenously (10 µg/kg per min infusion starting 10 min before heparin injection and continued until 15 min after protamine injection; $n = 8$). This dose of BAY 41-2272 was chosen on the basis of the results of a previous study in dogs.⁷ The vehicle group received 0.1 mL/kg per min dimethylsulphoxide under the same experimental conditions.

Plasma cGMP concentrations

Blood samples (3 mL) were collected from the femoral vein into heparinized syringes at selected time-points before and after protamine administration. Blood samples were collected in the presence of 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; 0.1 mmol/L). Plasma was obtained by centrifugation of whole blood (500 g for 10 min) and stored at -20°C until assayed. Levels of cGMP were determined using a commercial enzyme immunoassay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) after sample (500 µL) extraction on 2 mL ice cold ethanol, as described by the manufacturer in the immunoassay protocol booklet.

Activated partial thromboplastin time

The activated partial thromboplastin (APTT) time, a measure of the intrinsic coagulation pathway by a surface activator to a suspension of rabbit brain cephalin (Amex Alexin; Trinity Biotech, St Louis, MO, USA), was determined using 0.1 mL citrated canine plasma. Time to coagulation (in s) was determined manually.

Drugs

Protamine sulphate and IBMX were purchased from Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). Sodium pentobarbital (Hypnol[®]), fentanyl citrate and diazepam were obtained from Cristália. Heparin was obtained from Roche (São Paulo, Brazil). Compound BAY 41-2272 was provided by Pharma Research Center, Bayer AG (Wuppertal, Germany) and a stock solution (0.03%) was prepared in 30% dimethylsulphoxide (DMSO).

Statistical analysis

Results are reported as the mean $\pm$ SEM for n experiments. All statistical comparisons were performed using GraphPAD Instat (Version 3.00; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Variations within a group (compared with basal levels) or between groups were analysed by repeated-measures ANOVA followed by either Dunnett's test or Tukey's test, respectively. $P < 0.05$ was taken as indicating statistical significance.

RESULTS

Pulmonary hypertension caused by the heparin-protamine complex

Figure 1a shows that intravenous administration of heparin alone (500 IU/kg) in vehicle (DMSO)-injected dogs did not produce any significant changes in any of the basal haemodynamic parameters measured. In these animals, subsequent injection of protamine (10 mg/kg, i.v.; 3 min after heparin) caused a marked and transient rise in MPAP that was maximal within 2 min after injection (177% increase), decaying rapidly thereafter (111, 61 and 27% increases at 3, 5 and 15 min after protamine injection, respectively). This was accompanied by marked increases in IPVR values (320, 180, 140 and 56% increases at 2, 3, 5 and 15 min after protamine injection, respectively; Fig. 1b). Pulmonary capillary wedge pressure was

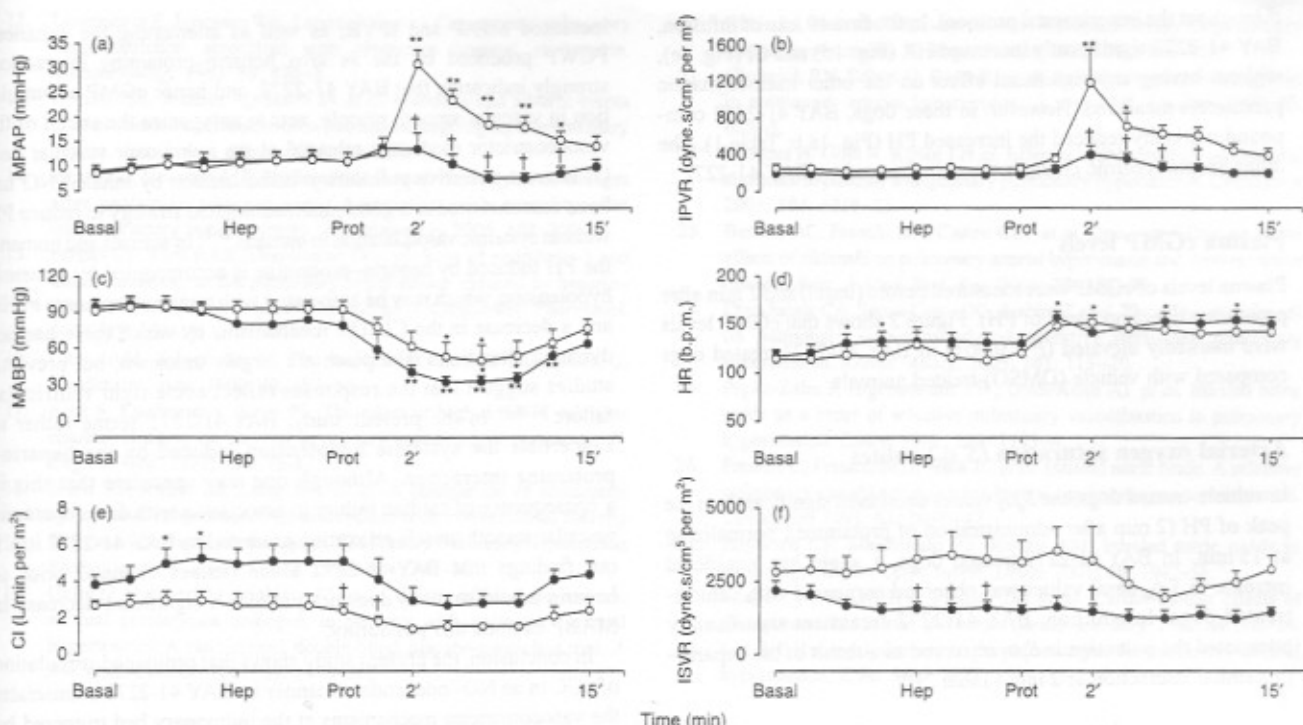


Fig. 1 Effect of BAY 41-2272 on haemodynamic changes induced by *in vivo* formation of the heparin-protamine complex in anaesthetized dogs. Heparin (Hep; 500 IU/kg) was administered intravenously 3 min prior to protamine (Prot; 10 mg/kg). BAY 41-2272 was infused at a rate of 10 µg/kg per min ($n = 8$; ●), whereas control dogs were infused with dimethylsulphoxide (0.1 mL/kg per min; $n = 8$; ○). MPAP, mean pulmonary arterial pressure; IPVR, index of pulmonary vascular resistance; MABP, mean arterial blood pressure; CI, cardiac index; HR, heart rate; ISVR, index of systemic vascular resistance; 2', 15', 2 and 15 min, respectively, after the administration of protamine. Values are the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with respective basal values; † $P < 0.001$ compared with control.

Table 1 Pulmonary capillary wedge pressure in anaesthetized dogs in vehicle (dimethylsulphoxide)- and BAY 41-2272 (10 µg/kg per min)-pretreated dogs, before and during pulmonary hypertension induced by heparin-protamine

	Pulmonary capillary wedge pressure (mmHg)	
	Vehicle	BAY 41-2272
Basal	3.3 $\pm$ 0.9	3.8 $\pm$ 1.6
Heparin	2.8 $\pm$ 0.8	4.4 $\pm$ 1.5
Heparin + protamine (2 min)	10.1 $\pm$ 1.4**	7.6 $\pm$ 2.8*
Heparin + protamine (15 min)	5.1 $\pm$ 1.2	3.6 $\pm$ 1.5

Values are the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ compared with respective basal values; † $P < 0.01$ compared with vehicle group.

Table 2 S_{O_2} values in anaesthetized dogs in vehicle (dimethylsulphoxide)- and BAY 41-2272 (10 µg/kg per min)-pretreated dogs, before and during pulmonary hypertension induced by heparin-protamine

	S_{O_2} (%)	
	Vehicle	BAY 41-2272
Basal	88.8 $\pm$ 1.2	94.2 $\pm$ 1.4†
Heparin	87.0 $\pm$ 1.6	93.5 $\pm$ 2.2†
Heparin + protamine (2 min)	72.7 $\pm$ 1.4*	85.2 $\pm$ 3.6**†
Heparin + protamine (15 min)	84.6 $\pm$ 3.2	89.0 $\pm$ 2.1

Values are the mean $\pm$ SEM. * $P < 0.001$ compared with respective basal values; † $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$ compared with the vehicle group.

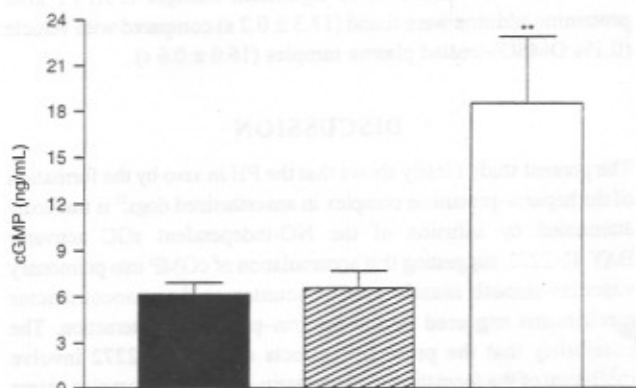


Fig. 2 Plasma levels of cGMP in anaesthetized dogs subjected to pulmonary hypertension as a result of the heparin-protamine interaction. Concentrations of cGMP were determined in blood samples obtained before (basal; ●) and 2 min after protamine injection in both vehicle (■)- and BAY 41-2272 (□)-treated dogs. ** $P < 0.001$ compared with basal or vehicle (dimethylsulphoxide) group.

significantly increased at 2 min, normalizing at 15 min (Table 1). In addition, a significant fall in MABP, which was maximal 3 min after protamine injection, was observed (Fig. 1c) and this was accompanied by a significant elevation in HR at 1 min after protamine injection (Fig. 1d). The CI was unchanged (Fig. 1e), whereas ISVR was slightly (albeit not significantly) reduced after protamine administration (Fig. 1f).

In a separate group, BAY 41-2272 (10 µg/kg per min) was infused 10 min before heparin injection and infusion was maintained

throughout the experimental protocol. In the first 10 min of infusion, BAY 41-2272 significantly increased HR (Fig. 1d) and CI (Fig. 1e), without having any significant effect on the other haemodynamic parameters measured. However, in these dogs, BAY 41-2272 compound markedly reduced the increased PH (Fig. 1a,b; Table 1). The other haemodynamic changes were unchanged by BAY 41-2272.

Plasma cGMP levels

Plasma levels of cGMP were measured before (basal) and 2 min after protamine injection (peak of PH). Figure 2 shows that cGMP levels were markedly elevated ($P < 0.001$) in BAY 41-2272-treated dogs compared with vehicle (DMSO)-treated animals.

Arterial oxygen saturation (S_{pO_2}) values

In vehicle-treated dogs, the S_{pO_2} values decreased significantly at the peak of PH (2 min after administration of protamine), normalizing at 15 min. In BAY 41-2272-treated dogs, a slight but significant increase in S_{pO_2} basal values was observed compared with vehicle-treated dogs. In addition, BAY 41-2272 treatment significantly attenuated the reduction in S_{pO_2} observed as a result of the heparin-protamine interaction at 2 min (Table 2).

Measurement of APTT

The addition of heparin (10 U/mL) to citrated plasma increased APTT from 14.00 ± 0.01 to 21.3 ± 0.6 s ($P < 0.001$). The addition of protamine (10 μ g/mL) significantly restored the APTT to basal values (14.3 ± 0.3 s; $P < 0.01$). In plasma samples treated with BAY 41-2272 (10 μ mol/L), no significant changes in APTT after protamine addition were found (17.3 ± 0.2 s) compared with vehicle (0.1% DMSO)-treated plasma samples (16.0 ± 0.6 s).

DISCUSSION

The present study clearly shows that the PH *in vivo* by the formation of the heparin-protamine complex in anaesthetized dogs¹⁵ is markedly attenuated by infusion of the NO-independent sGC activator BAY 41-2272, suggesting that accumulation of cGMP into pulmonary vascular smooth muscle acts to counteract the vasoconstrictor mechanisms triggered by the heparin-protamine interaction. The possibility that the protective effects of BAY 41-2272 involve inhibition of the formation of the heparin-protamine complex seems to be unlikely because BAY 41-2272 failed to affect the APTT in canine citrated plasma samples incubated with heparin and protamine.

It has been reported that PH triggered by the *in vivo* formation of the heparin-protamine complex is the consequence of the release of vasoconstrictor mediators from different cell types when the complex passes through the pulmonary vascular bed.¹⁶ Conventional vasodilator therapy for PH includes calcium channel blockers, prostacyclin (and its analogues) and endothelin receptor antagonists.¹⁷⁻²¹ More recently, phosphodiesterase (PDE) 5 inhibitors, such as sildenafil, in combination or not with other vasodilators, have been shown to reduce PH in both human patients^{22,23} and experimental animals,²⁴ strongly suggesting that compounds that act to activate the NO-cGMP pathway may constitute potential therapy for the treatment of PH. In the present study, infusion of BAY 41-2272 nearly abolished the

increased MPAP and IPVR, as well as attenuating the enhanced PCWP produced by the *in vivo* heparin-protamine interaction, strongly indicating that BAY 41-2272, and hence cGMP accumulation in vascular smooth muscle, acts to antagonize the action of the vasoconstrictor mediators released at the pulmonary vascular bed. Of interest, selective pulmonary vasodilation by inhaled NO has been demonstrated as a good pharmacological strategy to reduce PH without systemic vasodilation in humans.²⁵⁻²⁷ In animals and humans, the PH induced by heparin-protamine is accompanied by systemic hypotension, which may be associated with transient increases in HR and a decrease in the CI. The mechanisms by which these haemodynamic alterations take place are largely unknown, but previous studies suggest that the responses reflect acute right ventricular failure.^{12,28,29} In the present study, BAY 41-2272 seems rather to exacerbate the systemic hypotension induced by the heparin-protamine interaction. Although one may speculate that this is a consequence of cardiac failure in association with direct systemic vascular smooth muscle relaxation produced by BAY 41-2272 itself, our findings that BAY 41-2272 alone (values obtained prior to heparin administration) does not produce a significant decrease in MABP exclude this possibility.

In conclusion, the present study shows that prolonged stimulation of sGC in an NO-independent manner by BAY 41-2272 counteracts the vasoconstrictor mechanisms at the pulmonary bed triggered by *in vivo* heparin-protamine interaction. Therefore, BAY 41-2272 may constitute a promising drug in the treatment of this type of PH.

REFERENCES

- Hobbs AJ. Soluble guanylate cyclase: The forgotten sibling. *Trends Pharmacol. Sci.* 1997; **18**: 484-91.
- Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C *et al.* NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature* 2001; **410**: 212-15.
- Straub A, Stasch JP, Alonso-Alija C *et al.* NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2001; **11**: 781-4.
- Barakat JS, Teixeira CE, Okuyama CE *et al.* Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *Eur. J. Pharmacol.* 2003; **477**: 163-9.
- Kalsi JS, Bahadur G, Muneer A *et al.* Novel PDE5 inhibitors for the treatment of male erectile dysfunction. *Reprod. Biomed.* 2003; **7**: 456-61.
- Priviero FB, Barakat JS, Teixeira CE *et al.* Mechanisms underlying relaxation of rabbit aorta by BAY 41-2272, a nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase activator. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; **32**: 728-34.
- Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Cataliotti A *et al.* Cardioresenal and humoral properties of a novel direct soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272 in experimental congestive heart failure. *Circulation* 2003; **107**: 686-9.
- Evgenov OV, Ichinose F, Evgenov NV *et al.* Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs. *Circulation* 2004; **110**: 2253-9.
- Deruelle P, Grover TR, Storme L *et al.* Effects of BAY 41-2272, a soluble guanylate cyclase activator, on pulmonary vascular reactivity in the ovine fetus. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005; **288**: L727-33.
- Deruelle P, Grover TR, Abman SH. Pulmonary vascular effects of nitric oxide-cGMP augmentation in a model of chronic pulmonary hypertension in fetal and neonatal sheep. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005; **289**: L798-806.
- Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: A target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol. Ther.* 2001; **92**: 1-20.

12. Lowenstein E, Johnston WE, Lappas DG *et al.* Catastrophic pulmonary vasoconstriction associated with protamine reversal of heparin. *Anesthesiology* 1983; **59**: 470–3.
13. Kimmel SE, Sekeres M, Berlin JA *et al.* Mortality and adverse events after protamine administration in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Anesthesiol. Analg.* 2002; **94**: 1402–8.
14. Welsby LJ, Newman MF, Phillips-Bute B *et al.* Hemodynamic changes after protamine administration: Association with mortality after coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* 2005; **102**: 308–14.
15. Freitas CF, Faro RAR, Dragosavac D *et al.* Role of endothelin-1 and thromboxane A₂ in the pulmonary hypertension induced by heparin-protamine interaction in anesthetized dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2004; **43**: 106–12.
16. Carr JAM, Silverman N. The heparin-protamine interaction. *J. Cardiovasc. Surg.* 1999; **40**: 659–66.
17. Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* 1992; **327**: 76–81.
18. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA *et al.* A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1996; **334**: 296–302.
19. Galié N, Humbert M, Vachiéry J-L *et al.* Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; **39**: 1496–502.
20. Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ *et al.* Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2002; **346**: 896–903.
21. Channick RN, Sitbon O, Barst RJ *et al.* Endothelin receptor antagonist in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; **43**: 62S–5.
22. Wilkens H, Guth A, König J *et al.* Effects of inhaled iloprost plus oral sildenafil in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; **104**: 1218–22.
23. Barreto AC, Franchi SM, Castro CRP *et al.* One-year follow-up of the effects of sildenafil on pulmonary arterial hypertension and veno-occlusive disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005; **38**: 185–95.
24. Dias-Junior CA, Souza-Costa DC, Zerbini T *et al.* The effect of sildenafil on pulmonary embolism-induced oxidative stress and pulmonary hypertension. *Anesth. Analg.* 2005; **101**: 115–20.
25. Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT *et al.* Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; **338**: 1173–4.
26. Frostell C, Fratacci MD, Wain JC *et al.* Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; **83**: 2038–47.
27. Hayward CS, Macdonald PS, Keogh AM. Inhaled nitric oxide in cardiology. *Expert Opin. Invest. Drugs* 2001; **10**: 1947–56.
28. Shapira N, Schaff HV, Piehler JM *et al.* Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1982; **84**: 505–14.
29. Lee SH, Rubin LJ. Current treatment strategies for pulmonary arterial hypertension. *J. Int. Med.* 2005; **258**: 199–215.