UNICAMP

LUIZ ALBERTO FERREIRA RAMOS

"MELATONINA REDUZ ALTERAÇÕES DELETÉRIAS CARDÍACAS E PULMONARES EM RATOS PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA"

"MELATONIN REDUCES CARDIAC AND PULMONARY DELETERIUS ALTERATIONS IN DISABLED PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION MONOCROTALINE INDUCED RATS"

CAMPINAS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA



LUIZ ALBERTO FERREIRA RAMOS

"MELATONINA REDUZ ALTERAÇÕES DELETÉRIAS CARDÍACAS E PULMONARES EM RATOS PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA"

"MELATONIN REDUCES CARDIAC AND PULMONARY DELETERIUS ALTERATIONS IN DISABLED PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION MONOCROTALINE INDUCED RATS"

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia.

Doctorate Thesis presented to the Institute of Biology, of the State University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in Functional and Molecular Biology, area of Physiology.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO LUIZ ALBERTO FERREIRA RAMOS E ORIENTADO PELO PROF. DR. MIGUEL ARCANJO AREAS

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Ramos, Luiz Alberto Ferreira, 1960-

R147m

Melatonina reduz alterações deletérias cardíacas e pulmonares em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina / Luiz Alberto Ferreira Ramos. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

Orientador: Miguel Arcanjo Areas.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

Melatonina.
 Hipertensão arterial pulmonar.
 Monocrotalina.
 Eletrocardiografia.
 Ratos Wistar.
 Areas, Miguel Arcanjo, 1952-.
 Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
 Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Melatonin reduces cardiac and pulmonary deleterius alterations in disabled pulmonary arterial hypertension monocrotaline induced rats

Palavras-chave em inglês:

Melatonin

Pulmonary arterial hypertension

Monocrotaline

Electrocardiography

Rats, Wistar

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Miguel Arcanjo Areas [Orientador]

Dora Maria Grassi Kassisse

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Alexandre César Santos Rezende

Estela Maria Gonçalves

Data de defesa: 26-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

BANCA EXAMINADORA Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas (orientador) Assinatura Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes Assinatura Prof. Dr. Alexandre César Santos Rezende Profa. Dra. Estela Maria Gonçalves Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes Assinatura Profa. Dra. Emiliane Miguel Salomão Assinatura Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva

Assinatura

Abstract

Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is a disease characterized by increased pulmonary vascular resistance, higher pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy of the heart and impairs alveolar gas exchange and cardiac function. Furthermore, melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a hormone produced primarily by the pineal gland, which decreases the tone of vascular smooth muscle promoting a reduction in peripheral resistance, as well as cardioprotective effect due to its antioxidant action. The objective of this study was to evaluate the probable cardioprotective effect of melatonin in rats with PAH.

PAH was induced by administration of a single dose of monocrotaline (60mg/kg ip) on the 1st day of the experimental period. After 15 days, the time needed to install the HAP melatonin (10mg/kg i.p.) was administered daily further 13 days. The animals were divided into four experimental groups (n = 5): CO (control); MEL (control melatonin); MCT (monocrotaline); MCT + MEL (monocrotaline + melatonin). At the end of the experimental period (28 days), the animals were anesthetized (100mg/kg ketamine + xylazine 7mg/kg weight i.m.) to determine the ECG parameters and Heart Rate Variability (HRV). The animals were subsequently euthanized by deep anesthesia, give the hearts were resected to determine the cardiac biomarkers, antioxidant enzymes in cardiac tissue, hemodynamic parameters and the histological analysis of the coronary arteries were from the right ventricle. The ECG results showed that melatonin, in PAH rats, reduced changes in heart rate, atrial and ventricular depolarization, as well as in parameters indicative of risk of sudden death. Moreover, melatonin reduced the right ventricular hypertrophy, prevented the increase in medial thickness of the coronary arteries, increasing the activity of antioxidant enzymes in the heart of PAH animals, which may have contributed to the absence of ECG events indicative of myocardial ischemia, as observed in the MCT group. Regarding hemodynamic aspects melatonin prevented the reduction in mean arterial pressure, systolic pressure and left ventricular relaxation rate, thereby improving systolic and diastolic function in the animals studied. In conclusion, melatonin exerted a protective effect against heart changes resulted from monocrotaline-induced pulmonary hypertension.

Keywords: Melatonin, PAH, monocrotaline, electrocardiogram, wistar rats.



Resumo

A Hipertensão Arterial Pulmonar (HAP) é uma patologia caracterizada pelo aumento da resistência dos vasos pulmonares, aumento da pressão arterial pulmonar e hipertrofia do ventrículo direito do coração, prejudicando as trocas gasosas alveolares e a função cardíaca. Por outro lado, a melatonina (N-Acetil-5-metoxitriptamina), hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, diminui o tônus do músculo liso vascular promovendo redução da resistência periférica, assim como efeito cardioprotetor devido a sua ação antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar o provável efeito cardioprotetor da melatonina em ratos portadores de HAP.

A HAP foi induzida pela administração de dose única de monocrotalina (60mg/kg ip) no primeiro dia do período experimental. Após os primeiros 15 dias, tempo necessário à instalação da HAP, melatonina (10mg/kg ip) foi administrada diariamente, durante 13 dias. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=5): CO (controle); MEL (controle melatonina); MCT (monocrotalina); MCT+MEL (monocrotalina+melatonina). Ao final do período experimental de 28 dias, os animais foram anestesiados (ketamina 100mg/kg + xilazina 7mg/kg de peso i.m) para a determinação de parâmetros eletrocardiográficos e da Variabilidade da Freguência Cardíaca (VFC). Posteriormente, foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento anestésico, obtendo-se o coração para a determinação de biomarcadores cardíacos. enzimas antioxidantes do tecido cardíaco, parâmetros hemodinâmicos e análise histológica das artérias coronárias do ventrículo direito. Os resultados do ECG mostraram que a melatonina, nos animais portadores de HAP, minimizou as alterações na frequência cardíaca, na despolarização atrial e ventricular, assim como nos parâmetros indicativos de risco de morte súbita. Além disso, melatonina reduziu a hipertrofia ventricular direita, preveniu o aumento da espessura da camada média das artérias coronárias e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes do coração dos animais portadores de HAP, o que pode ter contribuído para a ausência dos eventos do ECG indicativos de isquemia miocárdica, como observados no grupo MCT. Quanto aos aspectos hemodinâmicos, melatonina preveniu a redução da pressão arterial média, da pressão sistólica e do índice de relaxamento ventricular melhorando, assim, a função sistólica e diastólica dos animais estudados. Em conclusão, melatonina exerceu efeito protetor contra as alterações cardíacas decorrentes da hipertensão arterial pulmonar induzida pela monocrotalina.

Palavras-chave: Melatonina, hipertensão arterial pulmonar, monocrotalina, eletrocardiografia, ratos Wistar.

Sumário

Abstract	Pág. vii
Resumo	Pág. ix
Sumário	Pág. xi
Dedicatória	Pág. xiii
Agradecimentos	Pág. xv
Lista de Figuras	Pág. xvii
Lista de tabelas	Pág. xix
Lista de Abreviaturas	Pág. xxi
Capítulo I	Pág. 23
I. Introdução	Pág. 25
I.a. Hipertensão Arterial Pulmonar	Pag. 25
I.b. Melatonina	Pág. 31
II. Objetivos	Pág. 37
II.a. Geral	Pág. 37
II.b. Específicos	Pág. 37
III. Materiais e Métodos	Pág. 39
III.a. Animais	Pág. 39
III.b. Grupos experimentais	Pág. 39
III.c. Histologia das artérias coronárias	Pág. 40
III.d. Biomarcadores de lesão cardíaca	Pág. 41
III.e. Atividade das enzimas antioxidantes do tecido cardíaco	Pág. 42
III.f. Parâmetros Eletrocardiográficos (ECG)	Pág. 42
III.g. Determinação da proteína quinase dependente de AMP-c	Pág. 42
(PKA) – Western Bloting	D 4 m 4.4
III.h. Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC)	Pág. 44
III.i. Parâmetros Hemodinâmicos	Pág. 45
III.j. Análise Estatística	Pág. 45

IV. Resultados e Discussão	Pág. 47
IV.a. Peso corpóreo – peso dos ventrículos direito e esquerdo	Pág. 47
IV.b. Histologia Cardíaca	Pág. 48
IV.c. Biomarcadores da Frequência Cardíaca	Pág. 53
IV.d. Atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco	Pág. 58
IV.e. Parâmetros Eletrocardiográficos (ECG)	Pág. 61
IV.f.1 Intervalo RR e Frequência Cardíaca	Pág. 67
IV.f.2 Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC)	Pág. 72
IV.f.3 Onda P	Pág. 77
IV.g. Parâmetros Hemodinâmicos Arteriais e Ventriculares	Pág. 86
V. Conclusão	Pág. 91
VI. Bibliografia	Pág. 93
Capitulo II	Pag. 121
Abstract	Pag. 123
Background	Pag. 125
Objectives	Pag. 127
Materials and Methods	Pag. 129
1. Animals.	Pag. 129
2. Vascular reactivity	Pag. 129
2.1 Obtaing Vascular rings	Pag. 129
2.2 Preparation of pulmonary artery rings	Pag. 130
2.3 Experimental Procedure	Pag. 130
2.4 Obtaining concentration-effect curve	
3. Measurements of antioxidative enzymes	Pag. 130
4. Measurements of Lipid Peroxidation	Pag. 131
5. Histological Parameters	Pag. 131
6. Statical Analysis	Pag. 131
7. Results and Discussion	Pag. 132
Conclusion	Pag. 137
References	Pag. 138
Table and Figures	Pag.143
	to Pag. 155

Dedicatória:

Dedico este trabalho a meus pais, Luiz Ramos e Joana D'arc (in memoriam) por

proporcionarem condições para minha formação pessoal, profissional e intelectual, não

mediram esforços para a realização das minhas aspirações profissionais.

Dedico a minha irmã Ana Lúcia pelo apoio incondicional nos momentos turbulentos, sempre

com palavras positivas, orações e incentivos, amiga incansável, parceira em todas as

conquistas, minha mentora intelectual.

E, por fim, dedico ao meu sobrinho Francis Grace pelo apoio nos momentos em que

necessitei de um amigo para conversar, pelo pai dedicado, auxiliando-me nos momentos

difíceis.

"A grande glória da vida não está em nunca cair, mas em se levantar a cada vez que caímos."

Nelson Mandela

xiii



Agradecimentos

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

Ao **Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas**, meu amigo e orientador, a quem admiro e respeito. Agradeço por todo incentivo, confiança e dedicação ao exercício do ensino. Pelo apoio, pelo amigo presente nos momentos mais difíceis de minha vida, os quais fortaleceram nossa opção de vida. Agradeço pela dedicação e amizade.

A **Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse** pela amizade, confiança e por proporcionar condições para a realização da minha pesquisa, pelos momentos fundamentais de interação social com os amigos do LABEEST, assim como, o apoio na elaboração da minha Tese.

A **Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes** pelo apoio nos momentos em que utilizei seu Laboratório. Educadora incansável, pesquisadora de extrema habilidade.

Aos meus amigos do Departamento de Fisiologia, Aline Toneto, Fernado Canova, Thiago Baptista, Rafael Ludemann, Renato Souto Maior, Marise Carnelossi, Alexandra, Amanda, Mariana, Daniele Mendes, Larissa Yuri, Heloísa, Elayne Dias, Emiliane Miguel Salomão, Laís Viana, Gustavo Santos, Bread, André (Romântico), Priscila Silva, Ana Gabriela, Aline Arouca e aos demais alunos dos laboratórios do Departamento de Fisiologia.

Ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia – UNICAMP.

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

Lista de figuras (Capítulo I)

Figura 1. Estrutura química da Monocrotalina	pág. 30
Figura 2. Organograma Experimental	pág. 40
Figura 3. Fotomicrografia do Ventrículo direito CO e MEL	pág. 49
Figura 4. Fotomicrografia do Ventrículo direito MCT e MCT+MEL	pág. 51
Figura 5. Espessamento da camada média das artérias coronárias	pág. 51
Figura 6. Troponina I	pág. 55
Figura 7. Diferenças entre eletrocardiogramas de humanos e ratos	pág. 65
Figura 8. Intervalo RR e Frequência Cardíaca	pág. 69
Figura 9. Atividade da PKA	pág. 72
Figura 10. Variabilidade da Frequência Cardíaca	pág. 76
Figura 11. Amplitude da Onda P	pág. 78
Figura 12. Amplitude da Onda R	pág. 79
Figura 13, Duração do Complexo QRS	pág. 80
Figura 14. Pico da Onda T	pág. 81
Figura 15. Intervalo QT e QTc	pág. 82
Figura 16. Segmento ST	pág. 84
Figura 17. Pressão Arterial Sistólica, Diastólica e Média	pág. 86
Figura 18. Máxima dP/dt e Mínima dP/dt	pág. 87
Figura 19. Índice TAU	pág. 88



Lista de Tabelas (Capítulo I)

Tabela 1. Peso corpóreo e peso dos ventrículos	pág. 47
Tabela 2. Efeito da Melatonina (MEL) sobre a atividade das enzimas	
antioxidantes no tecido cardíaco	pág. 59

Lista de Abreviaturas

ANOVA Análise de Variância

BMPR2 Receptor 2 da Proteína Morfogenética óssea

MEL Ratos controle Melatonina

CO Ratos Controle

ECG Eletrocardiograma

eNOS Óxido Nítrico Sintase endotelial

ET-1 Endotelina tipo 1

HAP Hipertensão Arterial Pulmonar

K⁺ íon potássio

MCT Ratos controle Monocrotalina

MCTP Monocrotalina pirrole

MCT+MEL Ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar

+ melatonina

Na⁺ íon Sódio

NO Óxido Nítrico

PDGF Fator de crescimento derivado de Plaquetas

PGI₂ Prostaciclina

mRNA RNA mensageiro

TGFβ Fator de crescimento Tumoral β

VEGF Fator de crescimento endotelial vascular



Capítulo I

"MELATONINA REDUZ ALTERAÇÕES CARDÍACAS EM RATOS
PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR
MONOCROTALINA"

I. INTRODUÇÃO

I.a. Hipertensão Arterial Pulmonar.

Hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença progressiva do sistema vascular dos pulmões que afeta, primariamente, as arteríolas pulmonares. A combinação de fatores como disfunção endotelial, vasoconstrição arteriolar pulmonar, proliferação e remodelamento do endotélio e das células do músculo liso endotelial e trombose induzem a contração progressiva dos vasos sanguíneos. Tal fato resulta em aumento da pressão arterial pulmonar consequente ao aumento progressivo da resistência vascular ao fluxo sanguíneo. Segundo McLaughlin et al., (2006) e Said et al., (2006), valores de pressão na artéria pulmonar em humanos acima de 25mmHg caracterizam a doença que pode ser desenvolvida por causas diversas. De acordo com o V Simpósio Mundial sobre Hipertensão Pulmonar, realizado em Nice, França (2013), HAP pode ser originada por diferentes fatores, sendo classificada como idiopática (HAPI, causada por razões desconhecidas), hereditária ou associada a outras doenças, tais como lesões de tecidos conectivos, infecção por HIV, hipertensão portal, anemia falciforme, doença cardíaca congênita e de origem genética. No caso da HAP por pré-disposição genética, verifica-se mutação no gene BMPR2 (Bone Morphogenetic protein receptor 2), o qual, em condições normais, estimula receptores TGFB responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular, tanto no período embrionário quanto na maturação dos tecidos já formados. Dessa forma, a mutação deste gene favorece o efeito pró-apoptótico das células do endotélio pulmonar, aumentando o risco do desenvolvimento da HAP (Ghofrani et al., 2009 e Said et al., 2006, Barreto et al., 2005).

Além disso, HAP tem sido relacionada com a exposição a fármacos e toxinas, especialmente anorexígenos como a fenfluramina e dexfenfluramina (Hunsinger e Wright, 1990; Etienne *et al.*, 2011), assim como aos efeitos tóxicos do óleo de colza (Canadian Oil Lower Acid, CANOLA) para fins não alimentares (Fonseca, 2009).

Paulin e Michelakis (2014) propõem, ainda, que a HAP pode ser consequente a uma anormalidade mitocondrial generalizada, a qual afeta diverso tecida, incluindo as células vasculares pulmonares, justificando o envolvimento de muitos órgãos nesta doença. Os autores acreditam que a mitocôndria pode integrar um tipo de sinalização anormal de causas diversas resultando no fenótipo celular característico da HAP conhecido atualmente, facilitando os esforços para a descoberta de novas terapias. Assim, concentrando os estudos para a correção das anormalidades mitocondriais poder-se-ia corrigir as consequências da HAP atacando a causa primária, simultaneamente, em todos os órgãos afetados.

Segundo Yen-Chun *et al.*, (2014), as primeiras evidências da HAP incluem sinais clínicos clássicos, tais como fadiga, letargia, dispnéia e síncope ao esforço. Frequentemente, o componente do fechamento da valva pulmonar na geração do 2° ruído cardíaco está associado com o murmúrio provocado pela regurgitação da valva tricúspide. Dentre os diversos métodos utilizados para o diagnótico da HAP, o eletrocardiograma (ECG) poderá registrar alterações na frequência cardíaca, bem como no parâmetro indicativo de hipertrofia ventricular direita, método que foi utilizado neste trabalho de tese.

Os sintomas da HAP, tais como dispneia ao esforço físico, retenção hídrica com edema nas extremidades inferiores do corpo e síncope está quase que inteiramente relacionados ao declínio progressivo da função ventricular direita causado pelo contínuo aumento na pós-carga para um ponto onde o lado direito do coração iniciaria o seu relaxamento (propriedade lusitrópica), mas falha em realizar essa função pelo fato do ventrículo direito encontrar-se incapacitado de atender ao crescente aumento progressivo da pós-carga (Yen-Chun *et al.*, (2014).

O ventrículo direito, em relação ao ventrículo esquerdo, é uma estrutura de paredes finas que bombeia o sangue sob-baixa pressão através de um sistema vascular pulmonar, o

qual é caracterizado por um alto fluxo. A troca rápida de dióxido de carbono e de oxigénio entre as hemácias e o ar alveolar, durante 1 segundo, requer uma camada muito fina de sangue exposto a uma grande superfície de ar. Isto é realizado pelo alvéolo, unidade de troca gasosa, que é composto por uma fina camada de células epiteliais alveolares, no lado do ar atmosférico, e outra fina camada de células endoteliais no lado do capilar pulmonar. O débito cardíaco, 4 a 6 litros de sangue bombeado por minuto pelo coração, deve se espalhar por toda a superfície de troca gasosa, equivalente a uma quadra de tênis de 70m², para que a troca seja eficiente. Tal fato requer um fluxo muito rápido e sob-baixa pressão, evitando lesões alveolares e edema pulmonar. Por essa razão, o ventrículo direito está apto a receber um grande volume de sangue (pré-carga) e bombear esse volume contra uma baixa resistência vascular (baixa pós-carga).

Pacientes com alto risco de morte são aqueles que apresentam progressiva doença cardíaca direita, elevada pressão atrial direita, baixa pressão parcial de oxigênio no sangue e episódios de hipoperfusão com dor pré-cordial ou síncope (perda súbita da consciência). Morte súbita poderá ocorrer consequente a uma insuficiência da função ventricular direita acarretando, consequentemente, em prejuízo do enchimento do ventrículo esquerdo, resultando em redução do fluxo de sangue cerebral seguida de assistolia cardíaca (Yen-Chun *et al.*, 2014),

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

Essas alterações cardiovasculares podem repercutir nos valores da pressão arterial sistêmica. Assim, Werchan *et al.*, 1989, não observaram alterações significativas em animais

portadores dessa doença. Entretanto, Lamberts *et al.*, (2007), demonstraram um aumento da pressão diastólica ventricular esquerda de ratos com HAP, como resultado do aumento do volume do ventrículo direito. Ishikawa *et al.*, (1995), Seyfarth *et al.*, (2000), Chen *et al.*, (2001) e Ahmed *et al.*, (2014), verificaram redução da pressão arterial média nesse modelo experimental.

De uma forma geral, pacientes com HAP apresentam disfunção endotelial pulmonar, caracterizada pela diminuição da expressão da NO-sintase endotelial (eNOS), enzima presente nas células endoteliais com consequênte diminuição da síntese e liberação de óxido nítrico (NO) pelo endotélio dos vasos pulmonares (Hongo *et al.*, 2005, McLaughlin e McGoon, 2006). O NO, descrito inicialmente por Furchgott e Zawadski (1980) como fator de relaxamento derivado do endotélio (EDFR), é a principal substância vasodilatadora endotelial.

Além do remodelamento vascular e do aumento do trabalho da musculatura cardíaca, verifica-se, também, diminuição da saturação de oxigênio arterial e venoso consequente à disfunção pulmonar. Esse fato implica numa resposta fisiológica vasoconstritora para ajustar o fluxo sanguíneo pulmonar para as áreas de baixa ventilação devido à liberação de fatores constritores derivados do endotélio ao mesmo tempo em que os fatores relaxantes encontram-se reduzidos (Tagaya et al., 2001) sendo, também, uma das causas da HAP (Goret et al., 2005; e Favret et al., 2001).

Por mais de três décadas, dois modelos animais têm sido utilizados para a investigação da hipertensão arterial pulmonar: exposição à hipóxia crônica e lesão pulmonar induzida por monocrotalina (MCT) (Stenmark *et al.*, 2009 e Gomez-Arroyo *et al.*, 2011). O modelo animal MCT continua a ser frequentemente investigado, principalmente por oferecer facilidade técnica, reprodutibilidade e baixo custo comparado com outros modelos de HAP.

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

Segundo Bruner *et al.*, (1983) e Taylor *et al.*, (1997), após sua administração, a MCT é biotransformada pelo fígado em monocrotalina pyrrole (MCTP), sua forma ativa, exercendo sua toxicidade, principalmente, nos sistemas cardiovascular e respiratório do rato. De acordo com Said *et al.*, (2006), Barreto *et al.*, (2005) e Kanno *et al.*, (2001), um dos fatores relacionado à fisiopatologia da HAP induzida por MCT é a hipertrofia ventricular direita, seguido de remodelamento vascular cardíaco.

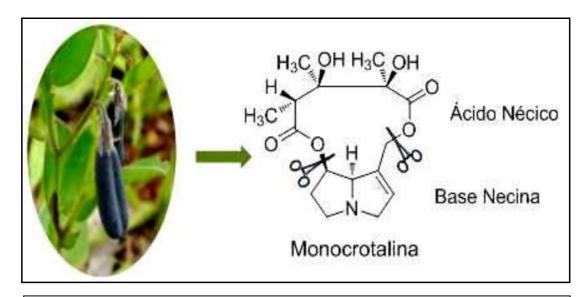


Figura 1. Estrutura química da monocrotaline, obtida da *Crotalária*spectabilis – SP – Fabaceae – Martinez, S. T.; Dos Santos, A. P.; Pinto, A. C.

(Rev. Virtual Quim. Vol 5; 2:300-311. 2013)

O efeito tóxico da MCT no rato é caracterizado por edema pulmonar, acúmulo de líquido no pericárdio e consequente fibrose cardíaca e pulmonar. Além disso, este modelo experimental também apresenta aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II, substância que promove hipertrofia cardíaca pelo aumento do conteúdo de colágeno no coração (Lamberts *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 1998; Lourenço *et al.*, 2006) e vasoconstrição periférica aumentando, consequentemente, a pressão arterial sistêmica.

Ainda, animais portadores de HAP induzida pela MCT, também apresentam inflamação pulmonar, reduzindo a capacidade dos pulmões, juntamente com os rins, de eliminarem a endotelina-1 em excesso no sangue e pulmões, fato que aumenta ainda mais a concentração dessa substância altamente vasoconstritora (Miyauchi *et al.*, 1993 e Barreto *et al.*, 2005).

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

farmacológicos denomina-se reatividade vascular (Luz *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2009), fato que também foi objeto de estudo de trabalhos anteriores.

Além disso, a atividade do sistema nervoso autônomo influencia diretamente o tônus vascular. Segundo Velez Roa et al., (2004), a HAP tem relação direta com o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático, sendo parcialmente mediada pelo reflexo quimiorreceptor devido à redução da concentração de oxigênio no sangue. Dessa forma, Yi et al., (2014), verificou redução dos valores relativos ao cálculo da Variabilidade da Frequência Cardíaca em indivíduos portadores de HAP, concluindo que essa metodologia pode ser útil como método não invasivo suplementar para o diagnóstico da disfunção autonômica, bem como do alto risco de arritmia ventricular, em pacientes acometidos por essa doenca.

I.b. Melatonina

A melatonina, um hormônio produzido pela glândula pineal, é biosintetizada predominantemente durante a noite, sendo que a luz tem efeito inibitório na sua secreção (Wurtman *et al.*, 1964, Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2012). A liberação de melatonina é sincronizada com o ciclo claro-escuro por um caminho multissináptico. A luz estimula a retina modulando a atividade do núcleo supraquiasmático (SCN) (Moore 1996), o qual funciona como um relógio biológico (Dubocovich *et al.*, 1998, Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2012). Neurônios GABA-érgicos são projetados a partir do SCN e do núcleo paraventricular (PVN) inibindo a saída constante de excitação para o núcleo intermediolateral simpático (Kalsbeek *et al.*, 2000). A estimulação simpática do núcleo intermediolateral, após interpolação do gânglio superior cervical, é direcionada para a glândula pineal induzindo a síntese de melatonina (Moore 1996). A atividade da taxa limitante das enzimas na glândula pineal é regulada pela noradrenalina na ligação de receptores pineais β1 e α1-adrenérgicos (Klein *et al.*, 1983, Reiter 1991, Ribelayga *et al.*, 1997). Sendo assim, outros sistemas

neurohormonais, (sistema renina-angiotensina) também podem modificar a secreção de melatonina (Baltatu *et al.*, 2002), exercendo papel importante na modulação das funções cardiovasculares pela melatonina. As concentrações de melatonina em indivíduos saudáveis são elevadas (80-150 pg/mL) durante a noite, enquanto, valores mais baixos são observados durante o dia (10-20pg/mL) (Kennaway e Voultsios 1998, Dominguez-Rodriguez *et al.*, 2012).

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

Desde a identificação dos sítios de ligação da melatonina (Vaneček *et al.*, 1987), três subtipos de receptores de membrana acoplados à proteína G foram identificados em mamíferos: MT₁ (anteriormente Mel1a) e MT₂ (Mel1b) (Dubocovich *et al.*, 1998, Dubocovich *et al.*, 2010). O receptor MT₁ está associado com vários segundos mensageiros; **a**) acoplado à proteína G_i diminui os níveis de monofosfato de adenosina cíclico (Capsoni *et al.*, 1994, Reppert *et al.*, 1996, Witt-Enderby e Dubucovich 1996); **b**) acoplado à proteína Gq ativa a fosfolipase-C resultando em aumento do cálcio citossólico (Brydon *et al.*, 1999); **c**) acoplado à proteína G ativa canais de potássio (Nelson *et al.*, 1996). Quanto aos receptores MT₂, foi demonstrado que, acoplado à proteína Gq, modula a hidrólise do 4-5-bifosfato de fosfatidilinositol (Dubocovich 1995, Dubocovich *et al.*, 2010). O terceiro receptor tipo *MT*₃, o qual tem baixa afinidade, provavelmente, não está acoplado à proteína G (Mor *et al.*, 1999).

Alta densidade de receptores de melatonina foi identificada no sistema nervoso central, particularmente na adenohipófise (Williams e Morgan 1988, Malpaux *et al.*, 1995, 2001), núcleo supraquiasmático (Vaneček *et al.*, 1987, Vaneček e Jansky 1989), núcleo paraventricular (Duncan *et al.*, 1989) e área postrema (Williams *et al.*, 1995). O receptor MT1 foi identificado no sistema cardiovascular, artéria caudal de ratos (Viswanathan *et al.*, 1990),

artérias coronárias humanas (Ekmekcioglu *et al.*, 2001) e em coração de ratos (Abete *et al.*, 1997), enquanto que o receptor MT2 foi encontrado em coração humano e artérias coronárias e aorta (Ekmekcioglu *et al.*, 2003).

A localização precisa desses receptores não foi completamente esclarecida. Postulase que, enquanto os receptores MT₁ são localizados primariamente nas células do músculo liso vascular, os receptores MT₂ são encontrados tanto em células endoteliais, quanto, em células do músculo liso vascular (Masana *et al.*, 2002).

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

Diversos estudos também têm demonstrado a participação da melatonina na regulação do sistema cardiovascular. Assim, alterações relacionadas com o envelhecimento podem ser beneficamente moduladas pela ação da melatonina no sistema cardiovascular de camundongos e ratos (Forman K. *et al.* 2010, Rodella LF. *et al.* 2011). Melatonina pode reduzir os efeitos da isquemia no coração (Tan *et al.* 1998; Sehirli et al, 2013), interagir

diretamente com a calmodulina (Turjanski *et al.*, 2004), inibindo os canais de cálcio (Satake *et al.* 1986, Shibata *et al.*, 1989) ou estimulando a bomba de cálcio de cardiomiócitos (Chen *et al.*, 1993). No sistema nervoso central, pelo fato da melatonina ativar receptores GABA-érgicos (Wang *et al.*, 2003) juntamente com sua capacidade de reduzir a síntese de Monofosfato de Adenosina cíclico (AMPc), esse hormônio pode participar da regulação do tônus simpático modulando a atividade do sistema nervoso autônomo sobre o coração. Além disso, melatonina pode modular o tono do músculo liso dos vasos sanguíneos interferindo na resistência periférica e, consequentemente, na pressão arterial. De acordo com Reiter *et al.*, (2010), melatonina reduz a pressão arterial média e a frequência cardíaca em ratos hipertensos. Além disso, a melatonina pode reduzir a hipertensão de origem renovascular devido, principalmente, a sua ação antioxidante.

Estudos têm relatado que existe maior risco de derrame e infarto do miocárdio no período da manhã coincidindo com a queda dos níveis de melatonina e, ainda, paciente com doença coronariana, quando comparados a indivíduos normais, apresentam níveis diminuídos de melatonina noturna acompanhada por aumento de noradrenalina (Macchi e Bruce, 2004).

Diferentemente da vitamina C, melatonina por apresentar característica lipossolúvel atravessa as barreiras biológicas facilmente (Kokkola T, 2007), diminuindo as arritmias cardíacas e reduzindo a oxidação lipídica consequente de processos isquêmicos cardíacos (Ersahin M. *et. al.*, 2009; Dominguez-Rodriguez *et. al.*, 2010; Reiter *et al.*, 2007; Reiter RJ. *et. al.*, 2009; Reiter RJ. *et. al.*, 2010).

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

Estudos recentes com modelos animais sugerem que melatonina contribui para a redução da hipertrofia cardíaca por sequestro de radicais livres e, por conseguinte, a incidência de insuficiência cardíaca (Reiter RJ. et. al., 2010). Reduz a remodelação ventricular esquerda (Simko F. et. al., 2009) devido à hipertensão, provavelmente por meio de seu efeito benéfico sobre a pressão arterial noturna (Reiter et. al., 2010-b). Muitos estudos em seres humanos e animais indicam a eficácia de melatonina na regulação da pressão arterial, não só através ação direta, mas também através de cardioproteção contra cardiotoxicidade mediada por drogas. Níveis suprimidos desta indolamina são encontrados em pacientes hipertensos (Oxenkrug GF. et. al., 2010).

II. OBJETIVOS

II.a. Geral: avaliar provável efeito cardioprotetor da melatonina em ratos Wistar portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

II.b. Específico: avaliar o efeito do tratamento com melatonina em ratos Wistar portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina sobre:

- a) Peso absoluto e relativo dos ventrículos;
- b) Histologia e morfometria das artérias coronárias;
- c) Determinação da Troponina I, biomarcadora de lesão cardíaca;
- d) Atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase no tecido cardíaco;
- e) Excitação e condução elétrica cardíaca, através do registro eletrocardiográfico e da determinação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA);
- f) Atividade do sistema nervoso autônomo, por meio da análise da variabilidade da frequência cardíaca;
- g) Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.a. Animais.

O protocolo experimental para este estudo foi aprovado pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, protocolo Nº. 1999-2. Ratos Wistar adultos pesando 250g, aproximadamente, foram colocados em gaiolas coletivas, cinco animais em cada, e alimentados com ração comercial e água *ad libitum* no Biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia, em ambiente com temperatura de 20 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12h00min.

III.b. Grupos experimentais.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais (n=5): CO (controle); MEL (controle melatonina); MCT (monocrotalina); MCT+MEL (monocrotalina+melatonina). A HAP foi induzida por dose única de monocrotalina (Crotaline) SIGMA Chemical Co. St. Louis, MO. USA, com administração intraperitoneal (60 mg/Kg ip) dissolvida em solução salina (NaCl) 0,9 %, pH 7.4, (Henkens IR. *et al.*, 2008). Melatonina - SIGMA Chemical Co. (St. Louis, MO. USA) administração intraperitoneal (10 mg/Kg ip) dissolvida em solução salina (NaCl) 0,9% e etanol (Acikel M. *et al.*, 2003) e administrada diariamente, no horário entre 10:00h e 12:00h, durante os 28 dias do período experimental. Ao final do período experimental, os animais foram submetidos à análise ECG para constatar o tramento com melatonina e, posteriormente submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico intramuscular (ketamina 100 mg/kg + xilazina 7 mg/kg de peso corpóreo im) para a realização dos procedimentos experimentais. Os animais dos grupos MCT e MCT+MEL foram submetidos à análise eletrocardiografica inicialmente para que o mesmo animal fosse o seu próprio controle durante o desenvolvimento da instauração da patologia. Uma vez

detectadas as alterações eletrocardiográficas significativas à doença, no grupo MCT+MEL iniciou-se o tratamento com melatonina (10 mg/Kg) por 13 dias consecutivos, perfazendo 28 dias de período experimental.

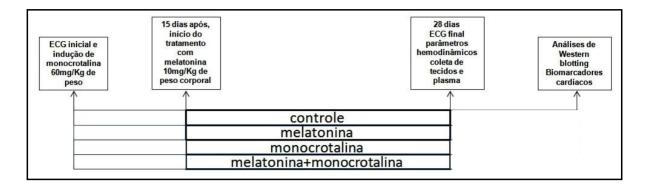


Figura 2. Organograma experimental

III.c. Histologia das artérias coronárias

Os corações dos animais foram isolados após serem submetidos à eutanásia e, logo em seguida, foram pesados e colocados em solução de formalina por 24 horas. Em seguida cada órgão foi retirado e desidratado com álcool etílico 70% durante 16 horas. Após esta passagem, seguiu-se desidratação com álcool 80% (1 hora), álcool 95% (1 hora), quatro passagens por álcool 100% (30 minutos cada passagem) e álcool 100%+xilol (1:1) por 30 minutos em estufa. Após, os tecidos foram transferidos para forma contendo parafina, permanecendo em estufa por 3 horas. Após resfriamento, cada bloco foi retirado das formas e o excesso de parafina removido. Os cortes histológicos foram realizados com micrótomo e fixados em lâminas com albumina. Após a fixação em lâminas, os cortes foram corados pelos métodos de hematoxilina eosina (HE) e pelo Ácido de Schiff. Foram obtidas imagens das lâminas no microscópio Leica (40X e 100x) sendo realizada a análise histológica utilizando-se o *software* Image Pro Plus.

III.d. Biomarcadores de lesão cardíaca.

Para a determinação dos biomarcadores foram utilizados anticorpos monoclonais, os quais foram covalentemente conjugados com microesferas Luminex e carboxiladas. Resumidamente, para determinar a concentração de anticorpos conjugação ideal, fracionada em soluções de microesferas de ações contendo 4 X 106 microesferas para centrifugar a 13.000 rpm por 2 min., removido o sobrenadante e ressuspensas as microesferas em H₂O destilada. Repetimos a centrifugação, o sobrenadante foi removido e ressuspenso as microesferas em 80 μL de 100 / L de fosfato de sódio monobásico. Adicionou-se então 10 μL cada 50g/L de N-hidroxysulfosuccinamida e 50 g/L EDC (ambos diluídos em H₂O destilada). Após vórtice de mistura, as microesferas foram incubadas durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. As microesferas foram então lavadas duas vezes em tampão lavagem 50 mmol/L (pH 5,0), e divididas em 8 tubos com aproximadamente 500.000 microesferas em cada tubo. Após vórtice de mistura, as microesferas foram incubadas durante 20 minutos no escuro à temperatura ambiente. As microesferas foram então lavadas duas vezes em tampão de lavagem 50 mmol / L (pH 5.0), e divididas em alíquotas para tubos com 8 500.00 microesferas em todos os tubos. Para determinar a eficiência de uma conjugação ótima, adicionou-se 25 μ L de anticorpo monoclonal em 200 μ L de Tampão de ensaio. A reação de acoplamento foi incubada durante 2 h. à temperatura ambiente com rotação. Depois de se lavar as esferas duas vezes com PBS contendo 10 g / L de BSA e 0,5 g / L de azida de sódio e armazenado no escuro a 2-8 ° C. Foi determinada a concentração de microesferas através da contagem, no Luminex100, 0,5 µL de microesferas diluídas 1: 400 em PBS contendo 10 g/L de BSA. Determinou-se a eficiência da conjugação por incubação 5000 microesferas em suspensão em PBS contendo 10 g/L de BSA com 400 ng/poco de R-ficoeritrina conjugado de cabra anti-rato F (ab')2 de imunoglobulinas para 30min (Kofoed et al., 2006).

III.e. Atividade das enzimas antioxidantes do tecido cardíaco.

Tecidos cardíacos foram homogeneizados em solução tampão gelada Tris-HCl (pH 7.4) por 1 minuto a 10.000 rpm. Posteriormente, o tecido homogenado foi centrifugado (5.000 g) por 60 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa peroxidase (GSP-px), de acordo com o ensaio colorimétrico descrito por Pan, L, Fu, J.H., Xue, XD *et al.*, (2009).

III.f. Parâmetros eletrocardiográficos (ECG).

Os ratos foram anestesiados com (ketamina + xilazina, 100mg/Kg + 7 mg/Kg de peso corpora, i.m.), tendo como veículo de diluição a solução de cloreto de sódio 0,9% (salina) e fixados na posição supina para registros eletrocardiográficos sob respiração espontânea. Os registros foram feitos com eletrodos na forma de agulhas hipodérmicas com eletrocardiógrafo computadorizado de quatro canais MLS360/7 ECG Analysis Module ADinstruments – Austrália (Knaapen *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2009). O eletrocardiograma foi realizado no vigésimo oitavo dia do período experimental.

III.g. Determinação da Proteína Quinase Dependente de AMP-c (PKA) - Western Bloting

Estudos sobre a participação da PKA na ativação dos canais Hyperpolarizationactived Cyclic Nucleotide (HCN) presentes nas células do nodo sinoatrial podem contribuir
para reduzir as dúvidas de como a estimulação simpática afeta a frequência cardíaca, e
como a PKA e os canais HCN atuam no nodo sinusal aumentando a frequência do coração
sob estimulação simpática (DiFrancesco and Tortora, 1991; Larsson, 2010). Pelo fato da
melatonina promover redução da frequência cardíaca, pode ser que tal efeito, pelo menos
em parte, possa estar associado à diminuição da ativação dos canais HCN em função de
provável redução da PKA e, por conseguinte, do AMP-c nesses respectivos canais.

Para tanto, foi utilizado o *Western bloting*, método em biologia molecular para detectar proteínas (PKA, no presente estudo) em um homogenato de células ou um extrato de um tecido biológico (coração, no presente trabalho). Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde são usados como sonda anticorpos específicos à proteína. Assim, pode-se examinar a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre diversos grupos.

Dessa forma, após os tratamentos, o coração dos animais que formaram os grupos experimentais foi congelado em nitrigênio líquido e homogeneizado a 4º C em tampão de lise, suplementado com Protease e *cocktail* de inibidores de fosfatase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Os tecidos homogeneizados foram mantidos em gelo durante 10 minutos e depois centrifugado durante 10 min. a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram coletados para a determinação de proteína e a análise por Western bloting. As concentrações de proteína foram analisadas utilizando um kit de ensaio Proteína Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories). Alíquotas de sobrenadantes contendo quantidades iguais de proteína (80-200 μg) foram separadas num gel de poliacrilamida a 70% por SDS-PAGE, e as proteínas foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (Bio-Rad Laboratories).

As bandas foram bloqueadas com leite seco sem gordura 5% em PBS (pH 7,4) e em seguida incubadas durante a noite a 4°C com um anticorpo primário específico para PKA (Santa Cruz Biotechnology). As membranas foram lavadas duas vezes durante 15 min, usando PBS-Tween 20 e incubadas com o anticorpo secundário ligado a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology). Para assegurar a igualdade de carga, bandas foram analisadas quanto à expressão de β-actina, utilizando o anticorpo β-actina (Santa Cruz Biotechnology).

III.h. Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC).

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados conforme descrito anteriormente. Sinais analógicos de eletrocardiogramas (ECG) de superfície foram gravados, durante cinco minutos, utilizando eletrodos em forma de agulha, implantados subcutaneamente nas extremidades dos membros. Os dados foram obtidos utilizando o sistema de aquisição de dados PowerLab e analisados pelo software LabChart 8.0 (ADInstruments – Austrália). A frequência cardíaca foi calculada a partir da gravação dos ECG.

Índices espectrais da variação da frequência cardíaca foram calculados utilizando o módulo de Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) do software LabChart 8.0 (ADInstruments - Austrália). No domínio do tempo, foi calculado o índice **RMSSD** (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos R-R normais sucessivos), que representa a atividade autonômica de forma geral, com ênfase à função parassimpática. De acordo com o domínio da frequência, ou seja, índices relativos às frequências das variações periódicas dos intervalos RR do eletrocardiograma, foram determinados os seguintes índices:

- a) Low Frequency (**LF**), faixa de baixa frequência (0,2 0,75 Hz), representando ambos os componentes do sistema nervoso autônomo com a predominância do sistema nervoso simpático.
- b) High Frequency (**HF**), faixa de alta frequência (0,75-3,0 Hz), é indicativo da ação do sistema nervoso parassimpático sobre o coração.
- c) relação **LF/HF**, reflete a interação entre os componentes simpático e parassimpático, determinando o equilíbrio da ação do sistema nervoso autônomo sobre o coração.

III.i. Parâmetros Hemodinâmicos e ventriculares - método direto.

Os animais foram anestesiados como descrito anteriormente. A seguir, uma cânula (PE 10) acoplada à outra cânula (PE 50) com solução salina (NaCl 0,9% + heparina) foi introduzida na artéria carótida direita para a determinação de parâmetros hemodinâmicos arteriais. Para a determinação de parâmetros hemodinâmicos ventriculares, utilizou-se de um cateter com micro manômetro devidamente introduzido no interior do ventrículo esquerdo. Posteriormente, os sensores foram conectados a um transdutor de pressão do tipo strain-gauge acoplado a um amplificador MLS370/7 Blood Pressure Module (ADInstruments – Austrália) e um sistema de aquisição de dados PowerLab 8/30. Para análise dos resultados foi utilizado o Software LabChart Pro (ADInstruments – Austrália). Os parâmetros avaliados foram:

- a) Pressão arterial sistólica, diastólica e média;
- b) dP/dt máxima: variação da pressão sistólica em função do tempo; avalia a capacidade contrátil do coração (inotropismo)
- c) **dP/dt mínima**: avalia a função diastólica;
- d) **Tau**: constante de relaxamento temporal do ventrículo esquerdo para avalição da atividade lusitrópica.

III.j. Análise estatística

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

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. a. Monocrotalina alterou o peso corpóreo e peso dos ventrículos direito e esquerdo, que foram modulados pela melatonina.

A tabela1 apresenta os dados referentes ao peso corpóreo e o peso dos ventrículos direito e esquerdo dos grupos experimentais.

Tabela 1. Peso corpóreo e peso dos ventrículos do coração dos grupos experimentais.

Parâmetros	CO	MEL	MCT	MCT+MEL
Peso corpóreo inicial (g)	341±9	336±6	331±11	326±10
Peso corpóreo final (g)	395±8	371±5	300±21 a	347±16 bc
Ganho de peso (g)	53±4	40±7	-14±17 a	13 ± 5 bc
VD (mg)	214±2	217±3	297±5 a	243±6 bc
VD relativo (mg/g)	0,60±0,03	0,58±0,01	1,01±0,02 a	0,70±0,03 bc
VE+septo(g)	894±4	881±3	903±5	898±3
VE+septo relativo (mg/g)	2,27±0,02	2,35±0,07	3,09±0,03 a	2,59±0,04 bc

Resultados expressos como média \pm SD. Parâmetros = VD (ventrículo direito); VE (ventrículo esquerdo). Grupos = CO (controle normal); MEL (controle melatonina); MCT (monocrotaline); MCT+MEL (monocrotaline tratado com melatonina). Estatística = P < 0.05: (a) CO X MCT; (b) CO X MCT+MEL; (c) MEL X MCT+MEL n = 5

Os resultados mostraram que a administração de monocrotalina promoveu perda de peso corpóreo e aumento da massa dos ventrículos direito e esquerdo (grupo MCT).

Nossos resultados estão de acordo com Steffen *et al.* (2008), os quais atribuíram à presença de processos inflamatórios associados à anorexia decorrentes da ação tóxica da monocrotalina em diversos sistemas do organismo. Tais efeitos podem ser resultantes de um estado de caquexia, ou seja, uma desordem metabólica caracterizada por inflamação,

anorexia e severa perda de massa muscular esquelética resultando em perda de peso corpóreo.

A caquexia pode estar associada, também, à doença cardíaca, ou caquexia cardíaca, sendo responsável pela alta taxa de mortalidade de pacientes diagnosticados com essa enfermidade, sendo que a presença de processo inflamatório é parte significativa desse quadro (Anker and Coats, 1999).

Dessa forma, avaliamos a presença de prováveis sinais de processos inflamatórios analisando cortes histológicos de artérias coronárias representativas dos grupos experimentais.

IV.b. Histologia cardíaca foi alterada com o efeito da monocrotalina e modulada com o tratamento com melatonina.

A figura 3 apresenta a fotomicrografia de corte transversal de artéria coronária do ventrículo direito representativa dos ratos dos grupos controle normal e do grupo controle melatonina. Observam-se túnica média, camada adventícia e lúmen vascular, com dimensões normais e ausência de infiltração inflamatória.

Por outro lado, nas figuras 4 e 5, os animais do grupo MCT apresentaram aumento da espessura da túnica média, diminuição do lúmen vascular, e infiltração leucocitária como consequência de processo inflamatório cardíaco.

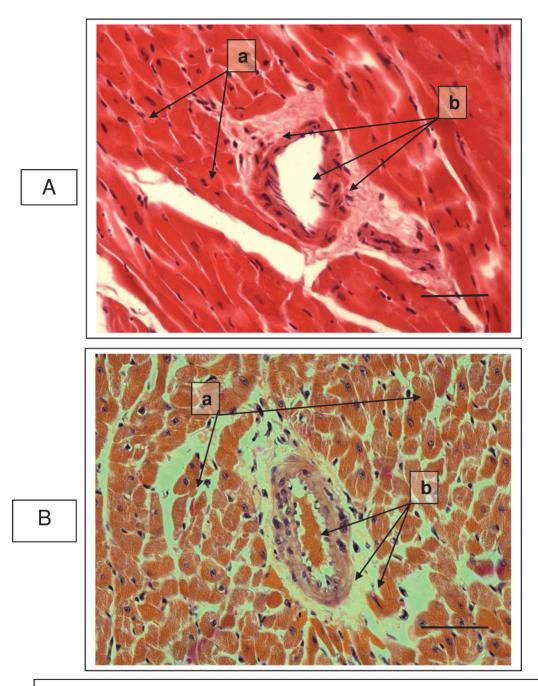
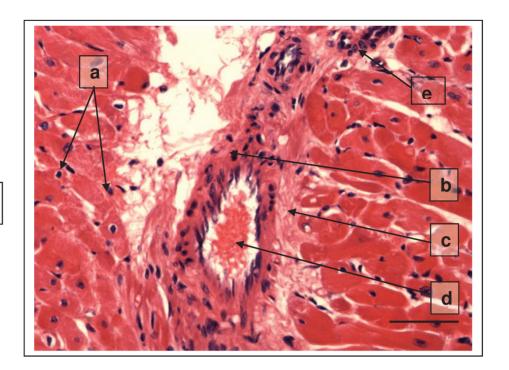


Figura 3. Fotomicrografia do ventrículo direito do coração de ratos dos grupos CO (**A**) e controle melatonina (**B**). Observam-se: (**a**) núcleos íntegros dispostos perifericamente; (**b**) artéria coronária com túnica média e camada adventícia sem espessamento com o lúmen preservado; ausência de infiltração linfocitária. Coloração HE. Obietiva 40 X.



MCT+MEL

MCT

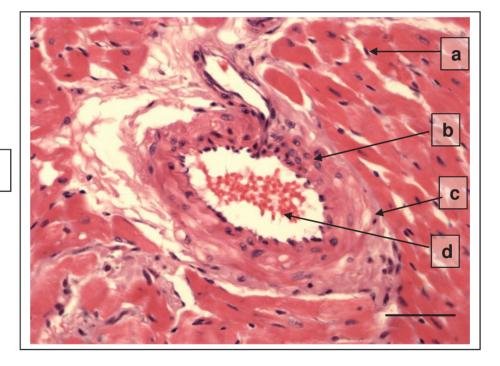


Figura 4. Fotomicrografia do ventrículo direito do coração de ratos dos grupos MCT e MCT+MEL. Observa-se no grupo MCT: (a) núcleos íntegros dispostos perifericamente; (b) espessamento da túnica média e da camada adventícia de artéria coronária (c); redução do lúmen (d) e infiltração leucocitária (e). Observa-se no grupo MCT+MEL: (a) núcleos íntegros dispostos perifericamente; (b) espessamento da túnica média e da camada adventícia (c) de artéria coronária; aumento do lúmen (d), em relação ao grupo MCT; ausência de infiltração leucocitária. Coloração HE. Objetiva 40 X.

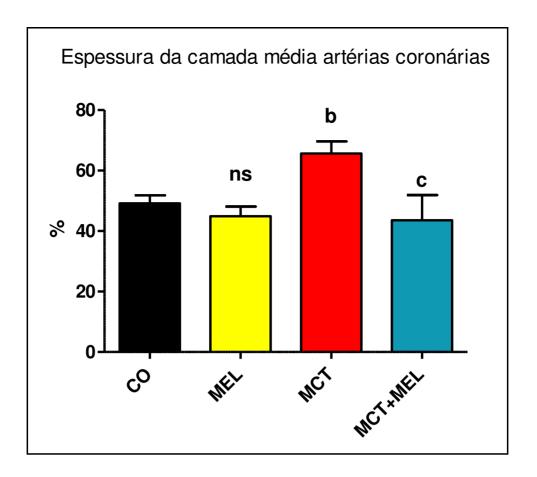


Figura 5. Espessamento da camada média das artérias coronárias dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT, (ns) não significativo; (n = 5).

Nossos resultados são corroborados por Akhavein *et al.*, (2007), os quais observaram em ratos tratados com monocrotalina um espessamento difuso da camada média das artérias coronárias, diminuição da área luminal e infiltração linfocitária, indicando presença de processo inflamatório em ambos os ventrículos. Xiaowei e David (2008) também observaram que a hipertrofia ventricular consequente à HAP induzida por monocrotalina, promoveu disfunção endotelial em artérias coronárias induzindo remodelamento vascular e isquemia cardíaca.

Assim, a vasoconstrição coronariana, observada no grupo MCT, pode ter colaborado para o comprometimento da ativação elétrica ventricular dos animais do grupo MCT e, provavelmente, alterado a função contrátil, fato este verificado por Akhavein *et al.*, (2007) e que será avaliado mais adiante quando discutirmos aspectos da hemodinâmica ventricular.

Por outro lado, nas mesmas figuras 4 e 5, observou-se que o grupo MCT+MEL apresentou redução no espessamento da túnica média comparado ao grupo MCT, mas sem alteração significativa em relação ao CO e MEL, assim como aumento do lúmen vascular e ausência de infiltração leucocitária, indicando preservação dos aspectos anatômicos e funcionais do coração, em relação ao grupo MCT.

Esses resultados são corroborados por Tare *et al.*, (2014), os quais observaram que o tratamento materno com melatonina reduziu a hipóxia fetal, melhorando a função cardíaca, o fluxo sanguíneo coronariano e a função contrátil do ventrículo direito de ratos recém nascidos devido, em parte, a ação antioxidante da melatonina, em modelo animal de crescimento restritivo.

Assim, o tratamento com melatonina, preveniu as alterações vasculares observadas no grupo MCT garantindo, assim, a oxigenação do músculo cardíaco dos animais do grupo MCTMEL, preservando o coração dos efeitos deletérios decorrentes de processos isquêmicos.

Além disso, nossos resultados mostraram que ocorreu infiltração leucocitária no coração dos animais do grupo MCT, evidenciando presença de processo inflamatório comprometendo, pelo menos em parte, a função cardíaca dos animais portadores de hipertensão arterial pulmonar.

Entretanto, tal fato não se verificou no grupo MCT+MEL, sugerindo que a melatonina reduziu processos inflamatórios cardíacos causados pela administração da monocrotalina devido, dentre outros fatores, a sua ação antioxidante, como veremos posteriormente. Isto

pode ter contribuído, também, para a redução da hipertrofia ventricular do grupo MCT+MEL, diminuindo as lesões cardíacas induzidas pela monocrotalina.

IV.c. Biomarcadores de lesão cardíaca alterados com monocrotalina foram recuperados com o tratamento com melatonina.

Os biomarcadores cardíacos são indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de intervenção farmacológica que fornecem informação considerando a exposição à doença, a extensão da lesão e o prognóstico (Oyama & Sisson, 2004; Sisson, 2012), analisados pelo método de citometria de fluxo (Luminex). O marcador cardíaco ideal precisa atender a vários critérios, tais como: 1) alta sensibilidade, sendo detectado precocemente mesmo em baixa quantidade em injúria miocárdica leve; 2) alta especificidade, não sendo detectáveis em outros órgãos ou tecidos; 3) ser facilmente quantificado; 4) apresentar boa janela diagnóstica, ou seja, aumentar mais precocemente e o retorno aos níveis basais ser mais demorado (Shinde *et al.*, 2004; Ladenson, 2007).

As troponinas vêm recebendo atenção crescente como marcadores altamente específicos de injúria celular (Godoy *et al.*, 1998) e atualmente são considerados como os preferíveis de injúria cardíaca em mamíferos (O'brien, 2008). A estrutura dessas troponinas é muito parecida entre as espécies (O'brien *et al.*, 1997). Compreendem um complexo protéico que forma parte do aparato contrátil, o complexo troponina-tropomiosina, encontrado dentro dos sarcômeros dos músculos estriados. Esse complexo age na regulação da contração muscular e é composto pela tropomiosina e por três troponinas: troponina C (TnC), I (TnI) e T (TnT) (Collinson *et al.*, 2001).

A TnI (subunidade inibitória), quando ligada à actina, age em conjunto com a tropomiosina, criando um obstáculo espacial e inibindo a interação da actina com a miosina. A TnC é a subunidade que se liga ao cálcio, e a TnT (subunidade estrutural) liga o complexo

troponina à tropomiosina. Na despolarização do sarcolema, há liberação de cálcio no citoplasma, e a TnC remove os efeitos inibitórios da Tnl. Isso faz com que a tropomiosina se desloque, resultando na remoção do obstáculo espacial da interação da actina-miosina e liberação da inibição da actina-miosina-ATPase, permitindo a hidrólise do ATP e a contração muscular. Quando o cálcio é bombeado de volta para o retículo sarcoplasmático, o complexo reverte para sua conformação original, inibindo a ação da ATPase e ocasionando o relaxamento muscular (Collinson *et al.*, 2001; O'brien *et al.*, 2008).

A TnC é idêntica, tanto no músculo esquelético, como no cardíaco. No entanto, os genes codificadores das TnT e TnI, cardíaca e esquelética, são diferentes, além de apresentarem sequências de aminoácidos distintas, o que permitiu que anticorpos monoclonais específicos pudessem ser desenvolvidos (Godoy *et al.*, 1998).

Em contraste à troponina I cardíaca (cTnI), a troponina T cardíaca (cTnT) não é totalmente específica do coração, sendo expressa também no músculo em regeneração, assim como no músculo esquelético normal. Consequentemente, sua concentração sanguínea pode aumentar na ausência de envolvimento miocárdio, por exemplo, em pacientes com polimiosite, rabdomiólise, doença muscular crônica e insuficiência renal (Shinde *et al.*, 2004).

A liberação de cTnl na circulação parece estar relacionada às áreas de necrose de cardiomiócitos de maneira irreversível, sendo o aumento da concentração proporcional à severidade da injúria. A maior parte da cTnl é encontrada no aparato contrátil e é liberada por degradação proteolítica. O rompimento das proteínas contráteis intracelulares como resultados de isquemia ocorre rapidamente, proporcionando um *pool* citosólico (Collinson *et al.*, 2001). O aumento dos níveis plasmáticos de Troponina I, por sua vez, constitui-se num

índice fortemente indicador de mortalidade (Eggers *et al.*, 2013), justificando sua análise neste experimento.

A figura 6 apresenta os dados referentes às concentrações plasmáticas de Troponina-I dos grupos experimentais.

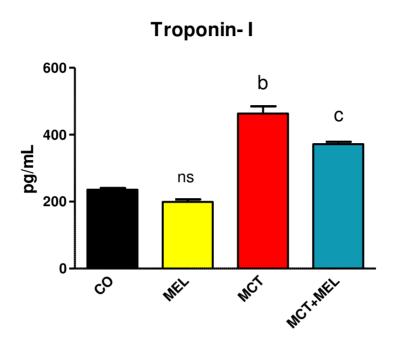


Figura 6. Troponina I. Concentração plasmática (picograma/mL). Grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT, (ns) não significativo; (n = 5).

Os nossos resultados mostraram que a expressão plasmática da Troponina I, está diminuída no plasma nos grupos CO e MEL, condizente com o baixo nível de lesão dos cardiomiócitos. Quanto ao grupo MCT, o nível de expressão plasmática está elevado significativamente devido à lesão cardíaca induzida pela ação monocrotalina em relação ao grupo CO. Tal lesão foi caracterizada pela hipertrofia ventricular direita que se desenvolveu

decorrente, em parte, do aumento da pós-carga imposta ao ventrículo direito pelo aumento da resistência vascular pulmonar.

Quando um coração desenvolve hipertrofia ventricular e subsequente doença cardíaca, verificam-se importantes alterações macroscópicas e moleculares decorrentes de processos adaptativos. Este remodelamento cardíaco está associado às alterações na expressão gênica levando a um aumento na expressão do peptídeo natriurético atrial e da interação entre as proteínas contráteis miosina e actina no músculo cardíaco. O aumento da carga biomecânica e a estimulação neuroendócrina podem constituir-se em estímulos para o início dessas alterações (Kogler *et al.*, 2003).

No presente estudo, a monocrotalina desenvolveu hipertrofia ventricular direita em consequência da obliteração das arteríolas pulmonares, como discutido no capítulo II, referente ao artigo submetido à publicação deste trabalho de tese. Assim, o aumento crônico da pós-carga causou, pelo menos em parte, a hipertrofia ventricular direita desenvolvida nos animais do grupo MCT. Hemodinamicamente, neste modelo animal a pressão arterial média permanece inalterada, indicando função ventricular esquerda normal. Entretanto, os animais do grupo MCT também apresentaram hipertrofia ventricular esquerda, resultando em alterações na pressão arterial média, como veremos adiante. Tal resultado pode ser atribuído à estimulação neuroendócrina de ambos os ventrículos durante a transição final da hipertrofia para a fase de doença cardíaca, caracterizada no grupo MCT, o que implicou em aumento das concentrações plasmáticos de Troponina I.

Em diversos modelos animais e também em humanos, doença cardíaca está associada com a redução na densidade dos canais transitórios de cálcio, mas, também, com um aumento da sensibilidade dos miofilamentos contráteis ao cálcio (Kogler *et al.*, 2003). Tais mudanças na sensibilidade ao cálcio podem estar relacionadas a diferentes níveis de fosforilação de proteínas constituintes do miofilamento fino, tal qual a troponina I (Tong *et al.*,

2004). Tais alterações podem mudar a relação força/frequência do coração, como veremos na discussão das propriedades hemodinâmicas ventriculares dos grupos experimentais, mais adiante.

Diversas causas podem aumentar a concentração plasmática de Troponina I (Martins, 2009), dentre as quais citamos aquelas que podem estar envolvidas nos animais com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina:

- a) Lesão direta dos cardiomiócitos desencadeada por processos inflamatórios no coração devido à ação tóxica da monocrotalina, conforme discutido anteriormente.
- b) a hipertrofia ventricular observada no grupo MCT exige maior consumo de oxigênio devido ao aumento da massa miocárdica, podendo ocasionar lesões caso essas necessidades não tenham sido atendidas.
- c) Insuficiência cardíaca crônica, refletindo perda progressiva de cardiomiócitos por isquemia/necrose subendocárdica ou apoptose por estiramento do miocárdio decorrente da hipertensão arterial. Tal insuficiência será discutida durante a avaliação das propriedades hemodinâmicas do coração
- d) aumento da atividade simpática, refletindo em maior atividade metabólica e, consequentemente, maior necessidade de oxigênio do músculo cardíaco, como demonstrado mais adiante ao estudarmos a Variabilidade da Frequência Cardíaca.
- e) doenças pulmonares que provoquem aumento de pressão no ventrículo direito, como é o caso da Hipertensão Pulmonar Arterial induzida pela monocrotalina, responsável pelas alterações de todos os itens anteriores, observados no grupo MCT.

Por outro lado, o grupo MCT+MEL teve redução significativa dos níveis plasmáticos da Troponina I, em relação ao grupo MCT, comprovando assim o efeito protetor da melatonina na redução das lesões cardíacas promovidas pela administração da monocrotalina no modelo de hipertensão arterial pulmonar.

Nossos resultados estão de acordo com Chen *et al.*, (2012) e Gogenur *et al.*, (2014), os quais também verificaram redução dos níveis plasmáticos de Troponina I, assim como a morbidade, em pacientes portadores de isquemia miocárdica. Os autores atribuíram esse resultado à melhora da irrigação sanguínea do miocárdio proporcionada pela ação anti-inflamatória e antioxidante da melatonina, como demonstraremos a seguir.

IV.d. Atividade de enzimas antioxidantes no tecido cardíaco.

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que ajuda a reduzir a gravidade dos danos oxidativos gerados pelos radicais livres. Dentre as enzimas antioxidantes incluem-se a Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e o sistema glutationa peroxidase (GSH-px). A SOD possui a função de proteção contra os danos gerados pelo O2° e é considerada a primeira linha de defesa do sistema de defesa antioxidante enzimático, representando um grupo de enzimas que catalisa a dismutação do O2° e a sequente formação de H₂O₂. A CAT está presente em todas as células eucarióticas e, em particular nos peroxissomos, estruturas celulares que usam o O₂ para neutralizar substâncias nocivas e produzir H₂O₂, a qual será convertida em água e O₂. A Glutationa peroxidase (GSH-px) presente no citosol da célula e nas mitocôndrias também tem a capacidade de transformar o H₂O₂ em água. Quando comparada à CAT, a GSH-px possui uma maior capacidade de remoção de H₂O₂, atuando também na remoção de peróxidos lipídicos (Finaud *et al.*, 2006).

A tabela 2 apresenta os valores da atividade das enzimas antioxidantes determinadas no tecido cardíaco.

Tabela 2. Efeito da melatonina (MEL) sobre a atividade de enzimas antioxidantes do tecido cardíaco de ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina (MCT).

	CO	MEL	MCT	MCT+MEL
SOD (U/mL)	226,34±4,59	219,09±5,83	166,17±0.25 a	188,29±0,76 bc
CAT (U/mL)	7,08±0,81	8,78±0,37	4,43±0,90 a	6,60±0,55 bc
GSH-px (U/mL)	11,49±0,03	10,57±0,02	7,81±0,02 a	9,42±0,03 c

Resultados expressos como média \pm SD. Parâmetros: SOD (superoxido dismutase); CAT (catalase); GSH-px (glutationa peroxidase). Grupos = CO (controle normal); MEL (controle melatonina); MCT (monocrotaline); MCT+MEL (monocrotaline tratado com melatonina). Estatística = P < 0.05: (a) CO X MCT; (b) CO X MCT+MEL; (c) MEL X MCT+ME n = 5

Os nossos resultados demonstraram que a monocrotalina reduziu significativamente a atividade das enzimas antioxidantes estudadas induzindo, dessa forma, redução da defesa tecidual cardíaca contra os danos oxidativos induzidos pela monocrotalina.

Dessa forma, concordamos com diversos autores que também verificaram redução da defesa enzimática antioxidante em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotaline. De fato, espécies reativas de oxigênio (ROS) e outras formas de radicais livres, influenciam significativamente a patogenia da hipertensão pulmonar (Bal *et al.*, 2013; Mohammadi. *et al.*, 2012). Segundo, Mohammadi *et al.*, (2012), a atividade das enzimas SOD, CAT e GSH-px apresentam alterações bifásicas dependendo do estágio da evolução

da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. Essas alterações incluem um aumento nas enzimas antioxidantes durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e redução da atividade dessas enzimas quando a doença já estiver sido instalada, momento este em que realizamos a coleta do material para a realização deste ensaio biológico.

A formação de ROS ocorre naturalmente através de vários processos metabólicos celulares; contudo, em excesso, a presença de ROS prejudica inicialmente a fisiologia celular e, subsequentemente, todo o organismo (Zuo *et al.*, 2012). Clinicamente, níveis elevados de ROS, como H₂O₂, por exemplo, tem sido observado em pacientes hipertensos (Lacy *et al.*, 2000). Embora o exato mecanismo da participação da ROS na geração da hipertensão não seja totalmente conhecido, modelos experimentais de hipertensão têm destacado a importância de alterações na função mitocondrial, assim como das enzimas xantina oxidase (XO) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), segundo Touyz *et al.*, (2011), sugerindo que a terapia antioxidante é um campo promissor de pesquisa em modelos de hipertensão induzida por estresse oxidativo (Zuo *et al.*, 2014).

Assim, melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), molécula produzida por uma grande diversidade de organismos, de algas a humanos, tem sua evolução associada ao metabolismo aeróbio como uma substância antioxidante (Tan *et al.*, 2010),

Nossos resultados mostraram que a melatonina aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidantes estudadas neste experimento proporcionando, dessa forma, aumento da defesa tecidual contra os danos oxidativos no coração dos animais portadores de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina. Diversos autores também verificaram esses mesmos efeitos da melatonina em doenças decorrentes do aumento anormal da produção de radicais livres, atuando diretamente na eliminação dessas substâncias nocivas e, indiretamente, através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Patel *et al.*, 2010; Sehirli *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

IV.e. Parâmetros eletrocardiográficos (ECG)

O ECG registra a atividade elétrica do coração, usualmente realizado em repouso. É um exame de baixo custo, de rotina, e que oferece muitas informações ao sobre o coração, tais como avaliação do ritmo e da frequência cardíaca, permitindo a identificação de arritmias, distúrbios na condução elétrica, hipertrofias ventriculares e isquemia cardíaca. As ondas, segmentos e intervalos que constituem o eletrocardiograma são:

- a) Onda P: corresponde à despolarização atrial, sendo a sua primeira componente relativa ao átrio direito e a segunda ao átrio esquerdo, a sobreposição das suas componentes gera a morfologia tipicamente arredondada. A Hipertrofia atrial causa um aumento na altura e/ou duração da Onda P.
- b) Segmento PR: é o segmento entre o início da onda P e início do complexo QRS. É um indicativo da velocidade de condução entre os átrios e os ventrículos e corresponde ao tempo de condução do impulso elétrico desde o nódo atrio-ventricular até aos ventrículos.
 O espaço entre a onda P e o complexo QRS é provocado pelo retardo do impulso elétrico no tecido fibroso que está localizado entre átrios e ventrículos.
- c) Complexo QRS: Corresponde a despolarização ventricular. É maior que a onda P porque a massa muscular dos ventrículos é maior que a dos átrios, Anormalidades no sistema de condução geram complexos QRS alargados.
- d) Intervalo RR: O Intervalo RR ou Ciclo RR. É o intervalo entre duas ondas R. Corresponde a freqüência de despolarização ventricular, ou simplesmente frequência ventricular.
- e) Segmento ST: período em que ocorre a sístole ventricular. O desnivelamento desse segmento pode ser indicativo de isquemia cardíaca.

- f) Onda T: Corresponde a repolarização ventricular. Normalmente é perpendicular e arredondada. A inversão da onda T indica processo isquêmico. Onda T de configuração anormal indica alteração na calcemia.
- g) Intervao QT: intervalo onde ocorre a despolarização e a repolarização venricular. O prolongamento desse intervalo é indicativo de risco de morte súbita.
- h) Intervalo QTc: é o intervalo QT corrigido pela frquência cardíaca, de acordo com a fórmula de Bazzet (QT/√(RR).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (2005), tem se valorizado técnicas não invasivas para o diagnóstico de determinadas doenças sem a necessidade de exames invasivos. No que diz respeito à hipertensão pulmonar, é importante enfatizar que a avaliação do paciente com o uso de metodologia não invasiva satisfaz alguns aspectos, porém não todos. Neste sentido, existe consenso na literatura sobre o fato de que, tanto a definição do estado hipertensivo como os critérios da resposta da circulação pulmonar a estímulos vasodilatadores, é baseada estritamente em medidas hemodinâmicas invasivas. Dessa forma, o eletrocardiograma, por exemplo, pode ser um método auxiliar extremamente útil no prognóstico do tratamento de indivíduos portadores de hipertensão arterial pulmonar.

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

Os registros eletrocardiográficos realizados em ratos variam de acordo com o tipo de técnica de gravação utilizada, presença ou ausência de anestesia, tipo de agente anestésico, posição do animal durante o registro, características do amplificador e velocidade e amplitude do registro. A idade, o peso, o sexo e a forma de contenção do

animal são fatores que também precisam ser considerados para o registro e análise do eletrocardiograma de rato.

O rato apresenta eletrocardiograma de difícil interpretação patológica em face de sua peculiar morfologia e alta frequência cardíaca, quando analisado isoladamente, de forma não seriada, ao longo de qualquer processo patológico que pode acometer o coração.

A orientação anatômica do coração do rato é semelhante à do homem, ou seja, os ventrículos direito e esquerdo encontram-se na posição anterior e posterior do coração. Consequentemente, as forças iniciais de ativação (despolarizantes) do músculo cardíaco deslocam-se da esquerda para a direita do coração; entretanto, são de baixa amplitude e, dependendo da posição do coração, são responsáveis pela forma aguda da onda Q.

Por outro lado, o vetor de ativação do ápice ventricular apresenta sentido da direita para a esquerda e de cima para baixo, evidenciado pela maior amplitude da onda R em todas as derivações, apresentando-se negativa em aVR (derivação amplificada no lado direitodo coração).

A última região do coração do rato a ser ativada é a base do ventrículo esquerdo representada pela presença invariável de uma onda S, de baixa amplitude, em todas as derivações.

A onda Q pode apresentar-se de forma rudimentar ou ausente. Ocasionalmente, uma discreta onda Q é observada em aVL (derivação amplificada no lado esquerdo do coração). A onda S, por outro lado, é registrada em quase todas as derivações. A onda R é sempre registrada invertida na derivação aVR.

Em contraste com o modelo de repolarização do ventrículo humano, o processo de repolarização dos ventrículos do rato apresenta um componente muito rápido, sendo que o pico da onda T ocorre imediatamente após a onda R, proporcionando falsa elevação do segmento S-T.

Deve-se destacar que a o segmento S-T curto ou mesmo ausente, se deve à repolarização ventricular no coração do rato começar antes mesmo que a despolarização ventricular tenha terminado.

A figura 7 apresenta a média do registro eletrocardiográfico representativa dos grupos experimentais, calculada pelo software PowerLab/ECG (ADinstruments – Austrália), durante cinco minutos.

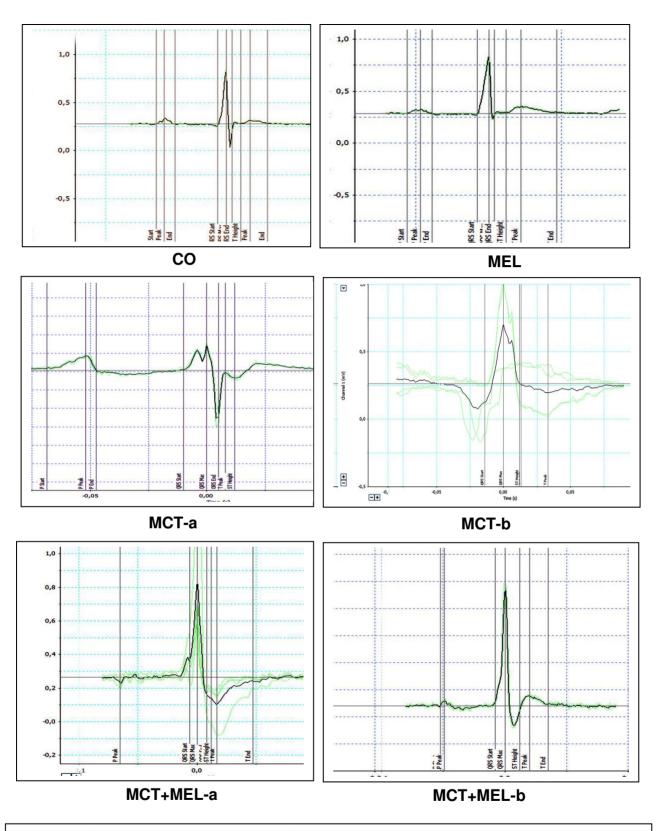


Figura 7. **Média do traçado eletrocardiográfico** ,registrado durante cinco minutos, representativa dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). As figuras foram aumentadas e alargadas para melhor comparação visual sem obedecer a critérios proporcionais nas suas dimensões.

Avaliamos os parâmetros eletrocardiográficos de acordo com as diretrizes para interpretação do eletrocardiograma de repouso, estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (Guimarães *et al.*, 2003 e Riera *et al.*, 2009).

Pode-se observar que o processo de excitação cardíaca dos grupos CO e MEL, que teve início no nodo sinoatrial, distribuíram-se em ambos os átrios produzindo a **onda P** positiva no ECG e, à medida que essa onda de despolarização passou pelos átrios, promoveu, provavelmente, a contração dos mesmos.

A seguir, a onda de despolarização dirigiu-se ao nodo atrioventricular (AV), onde ocorreu um retardo, permitindo que se completasse o enchimento ventricular. Este momento foi representado pelo segmento PR, normalmente isoelétrico. Após, o nódulo AV retransmitiu o impulso para os ventrículos, através do feixe de His, ramos direito e esquerdo, localizado no septo ventricular, e das fibras de Purkinje presentes no ápice e na base ventricular, tendo como consequência provável a contração dos ventrículos. despolarização ventricular resultou, portanto, nas três ondas denominadas de complexo QRS, decorrentes da despolarização do septo, do ápice e dá base ventricular, respectivamente. Registrou-se, também, uma linha de base isoelétrica após o complexo QRS (segmento ST) durante a qual ocorreu a sístole ventricular. Em seguida, verificou-se a repolarização ventricular originando a **onda T** e, a seguir, a diástole ventricular. A repolarização ventricular ocorreu do epicárdio para o endocárdio, contrariamente ao sentido da despolarização, gerando **onda T** assimétrica e positiva porque a região do ventrículo que repolarizou inicialmente foi o epicárdio que havia acabado de despolarizar. A repolarização atrial não foi registrada pelo ECG, pois aconteceu simultaneamente à despolarização ventricular, sendo mascarada por esse evento elétrico de maior voltagem. Finalmente, foi registrado o **intervalo QT**, período que compreendeu toda a atividade elétrica venricular (despolarização e repolarização), o qual foi corrigido pela frequência cardíaca (**QTc**), segundo a fórmula de Bazett (QTc = QT/√RR). Dessa forma, o ECG dos grupos CO e MEL apresentaram-se dentro dos aspectos de normalidade característicos da espécie em estudo.

Entretanto, o grupo MCT mostrou significativas alterações em relação ao grupo controle. De forma geral, observaram-se sinais evidentes de: a) **sobrecarga ventricular direita:** presença de onda P *pulmonale*, ou seja, apiculada e com aumento da amplitude; b) **bloqueio de ramo direito:** complexo QRS com entalhe e com maior duração, onda R com menor amplitude e onda S profunda; c) **alteração na repolarização ventricular:** c) infradesnivelamento do segmento ST e inversão da onda T (negativa) indicativa de isquemia subepicárdica; d) **prolongamento do intervalo QT**: indicação de risco de morte súbita.

Por outro lado, a administração de melatonina promoveu: a) redução da amplitude da onda P indicando diminuição da sobrecarga atrial direita; b) melhora na condução elétrica ventricular devido à ausência do bloqueio de ramo direito (QRS sem entalhe); c) melhora na irrigação do miocárdio indicada pela onda T positiva (ausência de sinais isquêmicos); d) redução do risco de morte súbita (redução do prolongamento do intervalo QT).

IV.f.1. Intervalo RR e Frequência cardíaca

A literatura consultada apresentou resultados antagônicos com relação aos efeitos da monocrotalina sobre a frequência cardíaca.

Dessa forma, Seyfarth *et al.*, (2000) e Leineweber *et al.*, (2003) observaram, em ratos portadores de HAP induzida por monocrotalina, diminuição do número de receptores alfa e beta adrenérgicos, principalmente no ventrículo direito, reduzindo a resposta dos tecidos cardiovasculares a substâncias agonistas simpáticas. Ahmed *et al.*, (2014), também

verificaram redução da frequência cardíaca em animais com hipertensão pulmonar, 21 dias após a administração de monocrotalina.

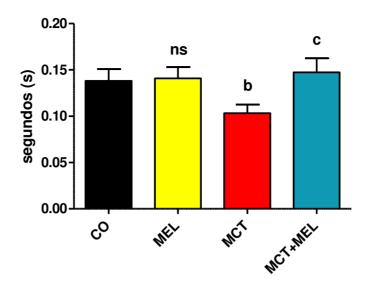
A figura 8 apresenta os resultados referentes ao intervalo RR e a frequência cardíaca dos animais dos animais dos grupos experimentais.

Nossos resultados mostraram que, com relação à frequência cardíaca, os grupos CO e MEL apresentaram ritmo sinusal não diferindo entre si nos períodos estudados. Por outro lado, verificamos, neste experimento, aumento significativo da frequência cardíaca no grupo MCT, em relação ao controle normal (CO), fato confirmado, também, pela redução do intervalo RR.

Assim, nossos resultados estão de acordo com Sanyal *et al.*, (2012), os quais também verificaram aumento da frequência cardíaca 4 semanas após a dose única de monocrotalina, mantendo-se elevada durante todo o período experimental, atribuindo esse fato, dentre outros fatores, à degeneração pré sináptica vagal promovida pela ação tóxica da monocrotalina.

Ainda, os autores também verificaram, além do aumento da frequência, hipertrofia ventricular direita e provável insuficiência cardíaca nos animais portadores de HAP, de modo similar aos nossos resultados descritos anteriormente. Segundo Usui *et al.*, (2006), animais com HAP apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de substâncias excitatórias da função cardíaca, como noradrenalina e angiotensina II, o que pode ter provocado o efeito cronotrópico positivo observado nos animais do grupo MCT, ao final de 30 dias de experimento.

Intervalo RR



Frequência Cardíaca

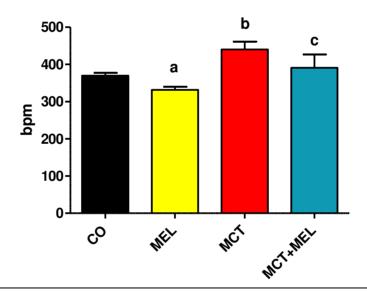


Figura 8. Intervalo RR e **Frequência Cardíaca** batimentos/minuto (bpm), Grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

Acreditamos que os resultados relativos à frequência cardíaca do grupo MCT podem ter sido consequente, pelo menos em parte, ao tempo de duração do experimento, uma vez que nossos animais foram submetidos à eutanasia 28 dias após a administração da

monocrotalina possibilitando, portanto, maior tempo para que a essa substância exerça seus efeitos tóxicos tanto sobre o coração quanto no controle autonômico cardíaco.

Assim, nossos resultados são corroborados por Sanyal *et al.*, (2012), os quais observaram encurtamento do intervalo RR e, consequentemente, aumento na frequência cardíaca a partir de 4 semanas após a administração da MCT, mantendo-se a frequência elevada durante todo o período experimental. Os autores atribuíram tais resultados à predominância da ação simpática sobre o coração, em detrimento do controle parassimpático, devido aos efeitos sistêmicos tóxicos da monocrotalina. Avaliaremos essa possibilidade ao discutirmos os resultados da Variabilidade da Frequência Cardíaca.

Quanto aos animais dos grupos tratados com melatonina (MEL e MCT+MEL), observou-se aumento do intervalo RR em relação ao MCT, ou seja restabeleceu o intervalo RR e, consequentemente, redução significativa da frequência cardíaca devido, provavelmente, à diminuição da ação simpática proporcionada pela melatonina nesse grupo experimental.

Nossos resultados estão de acordo com Nishiyama *et al.*, (2001), Ray (2003) e Sánchez-Hidalgo (2009), os quais também observaram modulação da frequência em animais tratados com melatonina, em diferentes modelos experimentais. Acreditamos que esse efeito foi devido, provavelmente, à redução da atividade simpática no nodo sinoatrial promovida por essa indolamina.

A atividade marca-passo no nodo sinoatral é altamente controlada pelo sistema nervoso autônomo, com a aceleração ou desaceleração sob estimulação simpática ou parassimpática, respectivamente. Esta regulação autonômica, segundo DiFrancesco (2010), está diretamente relacionada com a modulação intracelular do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), o qual encontra-se associado aos canais ativados durante a hiperpolarização sensíveis ao AMP-c (HCN). Esses canais produzem a "corrente funny",

responsáveis pelo influxo de Na⁺ e K⁺ contribuindo para a atividade marcapasso espontânea do nodo sinoatrial. Ainda, devemos considerar que a síntese de AMP-c é dependente da produção da Proteína Quinase A (PKA), a qual, por sua vez, é necessária para a sinalização dos receptores beta adrenérgicos nos canais HCN do nodo sinoatrial permitindo, portanto, a modulação simpática sobre a frequência cardíaca (St. Clair *et al.*, 2013).

Sabendo que a atividade da PKA é necessária para a regulação simpática da "corrente funny" podendo fosforilar diretamente os canais HCN4 do nodo sinoatrial e, assim, permitir a modulação noradrenérgica sobre a frequência cardíaca (Liao et al., 2011), decidimos avaliar a hipótese de que a PKA pode regular os canais HCN4 do nodo sinoatrial.

A figura 9 mostra a atividade da PKA no tecido cardíaco dos animais dos grupos experimentais. Pode-se observar que a melatonina reduziu a atividade da PKA tanto nos animais controle quanto no grupo MCT, contribuindo, pelo menos em parte, para a redução da frequência cardíaca observada nos grupos tratados com melatonina.

Liao et al., (2010), também demonstraram que a inibição da PKA reduziu significativamente a capacidade de agonistas beta adrenérgicos ativarem a "corrente funny" em miócitos de camundongos, porém os autores não utilizaram a melatonina nos procedimentos experimentais. Portanto, esses dados sugerem que a expressão dos canais HCN4 presente nas células marcapasso do coração pode ser regulada pela PKA, levantando a possibilidade desse mecanismo contribuir para a regulação simpática da frequência cardíaca. Deve ser destacado, também, que a melatonina circulante pode diminuir a frequência cardíaca, modulando, dentre outros fatores, a ação do reflexo baroceptor no controle da atividade cronotrópica. Esse efeito pode ser mediado por receptores de melatonina localizados na área postrema, localizada fora da barreira hematoencefálica, constituindo-se numa "janela" para a detecção dos níveis plasmáticos de melatonina (Campos et al., 2013).

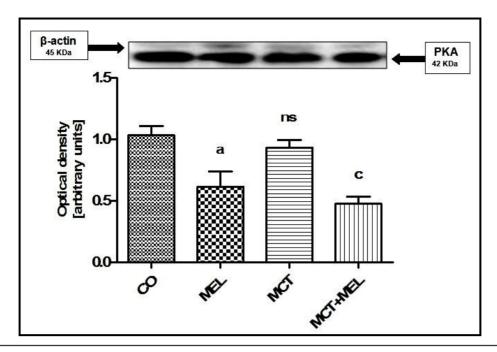


Figura 9. Quantificação da PKA dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

Como o reflexo baroceptor requer, necessariamente, a participação do sistema nervoso simpático e parassimpático para a regulação da atividade cardíaca, justifica-se a análise que faremos da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) como método indireto da avaliação da função autonômica sobre o coração, além da determinação dos níveis das concentrações teciduais da proteína quinase dependente de AMP-c (PKA), como proteína envolvida na resposta das células do nodo sinoatrial ao estímulo simpático.

IV.f.2. Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC)

O coração é um órgão que apresenta células capazes de gerar potenciais de ação, responsáveis pelo estabelecimento da frequência cardíaca cujo controle é feito, em parte pelo Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Este por sua vez está dividido em uma área simpática que atua sobre as estruturas auto excitáveis e o miocárdio e uma parassimpática

cuja atuação se manifesta, principalmente, sobre o nó sinoatrial. Dessa forma, a ação simpática promove o aumento da frequência cardíaca enquanto a parassimpática promove a sua diminuição. Por essa razão, modificações na frequência cardíaca são esperadas como respostas normais do organismo a estímulos fisiológicos e ambientais tais como: respiração. exercício físico, estresse, alterações hemodinâmicas, metabólicas, sono e desordens induzidas por doenças. A descoberta da relação entre o sistema nervoso autônomo e mortalidade por doenças cardiovasculares tornaram necessária à realização de estudos acerca do aumento da atividade simpática e redução da atividade parassimpática, condição essa encontrada em diversas doencas do sistema cardiovascular, e o desenvolvimento de marcadores quantitativos da atividade autonômica cardíaca, destacando-se a Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC). A VFC compreende as oscilações entre os intervalos RR dos batimentos cardíacos que refletem as modificações resultantes da atuação do SNA sobre o comportamento da frequência cardíaca (Task Force of the European Society of Cardiology, 1996; Rajendra et al., 2006). Por ser uma ferramenta não invasiva e de fácil utilização teve seu uso largamente difundido, porém por apresentar diversos índices a sua compreensão é complexa, apesar da aparente facilidade na sua utilização. A grande quantidade de trabalhos realizados e a complexidade apresentada na análise dos seus índices incentivou a Sociedade Europeia de Cardiologia e Sociedade Americana de Estimulação Cardíaca e Eletrofisiologia formarem uma força tarefa com o objetivo de padronizar a nomenclatura utilizada, os seus índices e seus métodos de mensuração. Após sua padronização tornou-se uma ferramenta que tem se mostrado eficiente na análise da função autonômica cardíaca em indivíduos saudáveis, atletas além de portadores de diversas doenças (Mark et al., 2011).

Dessa forma, uma alta variabilidade da frequência cardíaca é indicativa do funcionamento normal do sistema nervoso autônomo, sendo capaz de variar a frequência

dos batimentos cardíacos adaptando, dessa forma, o sistema cardiovascular, momento a momento, às mais diversas situações. Por outro lado, a baixa variabilidade indica prejuízo da atividade autonômica em função, por exemplo, de uma doença que esteja acometendo o organismo ou que ainda irá se manifestar (Nussinovitch *et al.*, 2011)

A análise no domínio do tempo reflete a atividade autonômica de maneira global, ou seja, se ela apresenta alguma alteração ou não e, dentre as variáveis que podem ser avaliadas, utilizaremos a RMSSD (raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos R-R normais sucessivos), que avalia o sistema nervoso autônomo como um todo, porém com ênfase à atividade parassimpática. A análise do poder espectral permite a caracterização quantitativa e qualitativa, individualizada e simultânea, em termos absolutos e relativos, das atividades simpática e parassimpática cardíacas, por meio das frequências das ondas e suas respectivas origens fisiológicas, das quais avaliaremos:

- a) componente de baixa frequência (LF, low frequency) (0,04 a 0,15Hz) mediado pelo reflexo barorreceptor, com influências mistas do simpático e parassimpático, porém com ênfase ao Sist. Nervoso **simpático**.
- b) componente de alta frequência (HF, high frequency) (0,15 a 0,40Hz) indicadora de tônus vagal, expressa a influência **parassimpática** sobre o nó sinusal e frequência respiratória.
- c) relação LF/HF expressão o equilíbrio simpatovagal sobre a atividade cardíaca.

A figura 10 apresenta os dados referentes à Variabilidade da Frequência Cardíaca dos grupos experimentais.

Nossos resultados mostraram que os animais do grupo MCT apresentaram redução da VFC, uma vez que os valores do índice RMSSD foram significativamente reduzidos, indicando provável prejuízo do controle parassimpático. De fato, observou-se redução significativa do índice HF, relativo à atividade parassimpática, e aumento significativo dos

valores de LF e da relação LF/HF evidenciando predominância da atividade simpática sobre a parassimpática associada à baixa VFC.

Portanto, o presente trabalho mostrou uma relação direta entre a doença cardíaca direita causada pela hipertrofia ventricular e a disfunção do sistema nervoso autonômico, nos animais do grupo MCT, os quais apresentaram redução significativa da VFC, Dessa forma, podemos inferir que a doença cardíaca induzida pela monocrotalina está diretamente relacionada ao prejuízo da função parassimpática nos animais do grupo MCT, fato que pode estar associado à severidade da doenca (Wensel *et al.*, 2009).

Nossos resultados estão de acordo com Sanyal e Ono (2002) e Sanyal et al., (2012), que também observaram acentuada diminuição da VFC com redução similar nos valores HF e relação LF/HF, em ratos e humanos, respectivamente, portadores de hipertensão arterial pulmonar.

Entretanto, de acordo com Maarman *et al.*, (2014) a administração de melatonina, devido a sua ação antioxidante, reduziu a hipertrofia ventricular direita melhorando diversos parâmetros cardiovasculares, como discutido anteriormente, preservando a função autonômica sobre o coração, refletindo no maior equilíbrio da relação simpatovagal (LF/HF) proporcionando, assim, maior variabilidade da frequência cardíaca nos animais do grupo MCT+MEL, em relação ao grupo de ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina

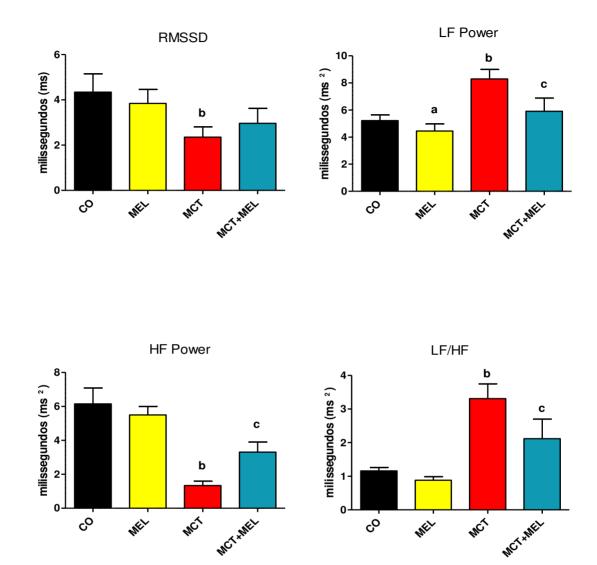


Figura 10. Variabilidade da Frequência Cardíaca determinada no domínio do tempo (**RMSSD -** raiz quadrada da média dos quadrados das diferenças entre intervalos R-R normais sucessivos) e no domínio da frequência (**LF** – componente de baixa frequência; **HF –** componente de alta frequência; LF/HF (índice de relação simpatovagal sobre o coração). Grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

IV.f.3. Onda P.

A figura 11 apresenta os dados relativos à amplitude da onda P do registro eletrocardiográfico dos grupos experimentais. Foi observado aumento na amplitude da onda P nos animais do grupo MCT, em relação ao grupo controle normal (CO).

Essa alteração eletrocardiográfica é representativa do quadro de hipertensão pulmonar, sendo denominada onda P "pulmonale", termo empregado para descrever o comprometimento do ventrículo direito consequente de uma desordem pulmonar como, por exemplo, a hipertensão arterial pulmonar, dentre outras causas.

Pelo fato da melatonina ter exercido efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido pela monocrotalina, essa alteração na onda P foi revertida pelo tratamento com melatonina (grupo MEL+MCT), sendo compatível com menor sobrecarga ao lado direito do coração. Portanto, o tratamento com melatonina melhorou significativamente a função atrial direita, melhorando, provavelmente, a pré-carga e, consequentemente, o enchimento ventricular, o débito cardíaco e a perfusão tecidual, como pretendemos demonstrar, mais adiante, pela avaliação dos parâmetros hemodinâmicos ventriculares.

. Essa alteração na onda P indicativa de disfunção atrial e ventricular direita pode ser acompanhada por outras anomalias eletrocardiográficas, tais como QRS de baixa amplitude em várias derivações e modificação na morfologia da onda T, decorrentes de alterações no processo de despolarização e repolarização ventricular.

Amplitude P O.08 O.06 O.04 O.02 O.00 NIEL NIEL NIEL NIEL

Figura 11. **Amplitude da onda P** dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

A figura 12 apresenta a amplitude da onda R dos animais dos grupos experimentais. De fato, observou-se redução significativa na amplitude de R nos animais com hipertensão arterial pulmonar (grupo MC). A baixa voltagem está relacionada à presença do derrame pericárdico ou à grave deterioração na função ventricular (Wynne and Braunwald, 1997), decorrente dos efeitos deletérios da hipertensão arterial pulmonar ao sistema de excitação e cardíaca dos animais do grupo MCT.

Nossos resultados são corroborados por Henkens *et al.*, (2007), os quais ponderaram que alterações na magnitude do QRS podem ser explicadas pelo prejuízo da ativação ventricular direita, contribuindo negativamente para a atividade despolarizante ventricular. Por outro lado, a melatonina preveniu as alterações na amplitude do complexo QRS, atenuando as alterações no coração induzidas pela hipertensão arterial pulmonar.

Amplitude R

Figura 12. **Amplitude da onda R** dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

A figura 13 apresenta a duração do complexo QRS dos animais dos grupos experimentais. Observou-se que a monocrotalina retardou significativamente a duração da ativação ventricular devido, provavelmente, ao maior tempo necessário para despolarizar a maior massa ventricular verificada no grupo MCT. A hipertrofia, principalmente do ventrículo direito, foi desenvolvida, como visto anteriormente, pela sobrecarga imposta ao lado direito do coração devido ao aumento da resistência dos vasos pulmonares ao fluxo sanguíneo nos animais portadores de hipertensão arterial pulmonar (grupo MCT).

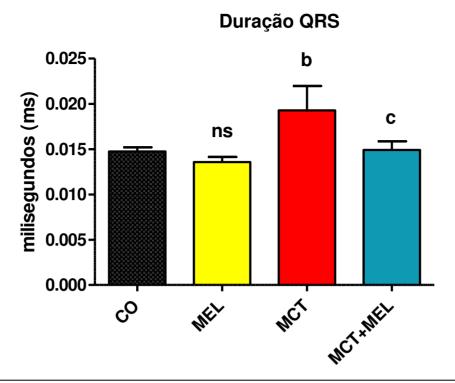


Figura 13. **Duração complexo QRS** dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

Nossos resultados estão de acordo com Ahmed *et al.*, (2014), os quais também verificaram aumento da duração do complexo QRS em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina.

A figura 14 apresenta a amplitude da onda T dos animais dos grupos experimentais. Observou-se que a hipertensão arterial pulmonar induziu a presença de onda T negativa indicativa de isquemia epicárdica, outra característica dessa doença, como consequência de alterações no processo de repolarização decorrentes da hipertrofia e da inflamação ventricular. A isquemia, por sua vez, proporciona alto risco de infarto do miocárdio. Por outro lado a administração de melatonina (grupo MCT+MEL) reverteu esse processo atenuando os efeitos prejudiciais da HAP na atividade elétrica ventricular.

Amplitude onda T

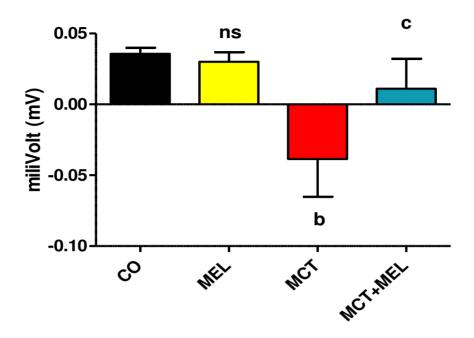


Figura 14. Amplitude da onda T dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

Assim, a lentificação na condução intraventricular do potencial de ação consequente à hipertrofia cardíaca foi responsável pelo aumento da duração do complexo QRS, promovendo, assim, aumento significativo na duração dos intervalos QT e QTc (QT corrigido pela frequência cardíaca) do ECG, os quais compreendem a despolarização e a repolarização ventricular (figura 15).

O prolongamento significativo dos intervalos QT e QTc do grupo MCT, predispos esses animais ao risco de morte súbita por fibrilação ventricular. De fato, Satoh *et al.*, (2004), atribuíram à hipertensão pulmonar as alterações cardíacas responsáveis pelo óbito súbito de

um paciente, embora não tenha sido possível ao autor explicar o mecanismo responsável pelo prolongamento do intervalo QT.

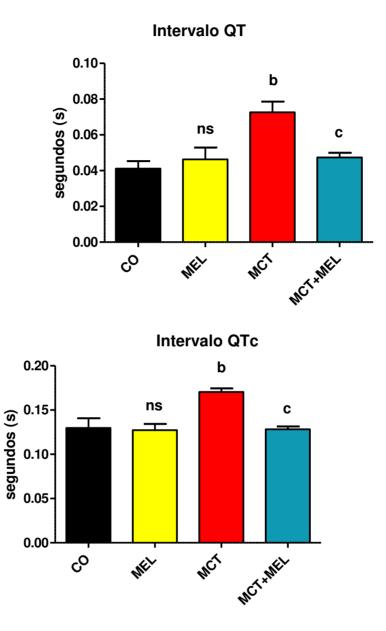


Figura 15. **Intervalos QT e QTc** dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT; (ns) não significativo; (n = 5).

Nossos resultados são corroborados por Uchino *et al.*, (2008), os quais também encontraram prolongamento do intervalo QT em ratos tratados com monocrotalina sugerindo a hipótese de alterações no funcionamento de canais voltagem-dependentes responsáveis pelo influxo de sódio e de canais transitórios de potássio pelos quais ocorre o efluxo desse íon. Rich *et al.* (2013), também verificaram que o intervalo QTc está diretamente correlacionado com o aumento do volume diastólico final do ventrículo direito e inversamente com a fração de ejeção do mesmo ventrículo. Os autores concluíram que o prolongamento do intervalo QTc é um índice cardíaco independente preditor de mortalidade em pacientes portadores de HAP. Sap *et al.*, (2013) e Ryan and Archer (2014), também observaram aumento do risco de arritmias atriais e ventriculares decorrentes do prolongamento do intervalo QT, em pacientes com HAP.

Por outro lado, melatonina reduziu significativamente o aumento do intervalo QT dos animais tratados com monocrotalina, em concordância com os demais parâmetros eletrocardiográficos observados neste experimento que apontam para uma ação cardioprotetora da melatonina.

Assim, a melatonina proporcionou nos animais do grupo MCT+MEL, menor grau de hipertrofia ventricular o que acarretou em redução do prolongamento dos intervalos QT e QTc diminuindo o risco de morte súbita decorrente das alterações cardíacas desencadeadas pela hipertensão arterial pulmonar.

A figura 16 apresenta as características do segmento ST dos animais dos grupos experimentais.

Segmento ST

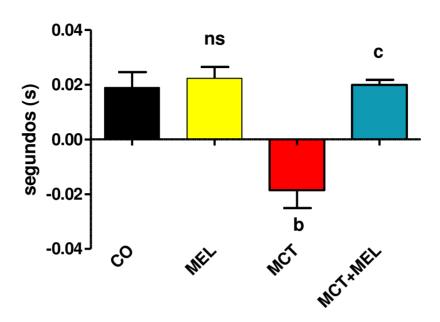


Figura 16. Segmento ST dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT, (ns) não significativo; (n = 5).

O desenvolvimento de depressão no segmento ST, observada no grupo MCT, representa um retardo na repolarização ventricular, o qual poderia ser decorrente da ação tóxica da monocrotalina no coração ou da deficiência na condução elétrica cardíaco, como sugerido pelo aumento da duração do complexo QRS decorrente.

Alterações do segmento ST são frequentemente associadas com isquemia, estresse oxidante ou hipertrofia ventricular em seres humanos (Mehdi S. Hazari *et al.*, 2009). De fato, a hipertrofia ventricular direita, decorrente de processos mal adaptativos do coração, pode promover rarefação dos capilares ventriculares ou redução da pressão de perfusão das

artérias coronárias desenvolvendo, assim, um processo isquêmico ventricular (Ryan e Archer, 2014).

Johnston *et al.*, (1981); Osborne (1981) e Lança (1981), afirmaram que as mesmas condições que causam alterações do segmento ST no ECG humano, isquemia, por exemplo, também causam mudanças correspondentes no ECG de rato. Dessa forma, depressão do segmento ST e alterações na morfologia da onda T são alterações agudas que podem ser indicativos de isquemia e aumento do risco de infarto do miocárdio (Alpert *et al.*, 2008). Este achado eletrocardiográfico tem fundamental importância na classificação das síndromes coronarianas agudas e reflete o fenômeno fisiopatológico subjacente; ou seja, lesões subtotais causando correntes de lesão subendocárdica determinam o infradesnivelamento do segmento ST, enquanto eoclusões agudas gerando isquemia transmural causam o supradesnivelamento do segmento ST.

Por outro lado, o tratamento com melatonina diminuiu a depressão do segmento ST, indicando provável redução do quadro isquêmico e consequente melhora na perfusão cardíaca, ou seja, promoveu aumento do diâmetro das artérias.

Nossos resultados são corroborados por Grossini *et al.*, (2011), os quais verificaram, em porcos anestesiados, que a administração intracoronariana de melatonina promoveu aumento tanto do fluxo sanguíneo nas artérias coronárias quanto da contratilidade cardíaca, efeitos mediados por receptores melatoninérgicos, liberação de óxido nítrico (NO) e receptores β-adrenérgicos cardíacos. Ainda, Gögenur *et al.*, (2014), verificaram significativa redução da morbidade em pacientes com isquemia cardíaca tratados com melatonina. Esses pacientes apresentaram redução das alterações do segmento ST, utilizado como marcador de doença cardíaca isquêmica, como resultado da menor ocorrência de isquemia miocárdica, após cirurgia reparadora de aneurisma na aorta abdominal.

IV.g. Parâmetros Hemodinâmicos Arteriais e Ventriculares.

A figura 17 apresenta os resultados das pressões arteriais sistólica, diastólica e média dos grupos experimentais.

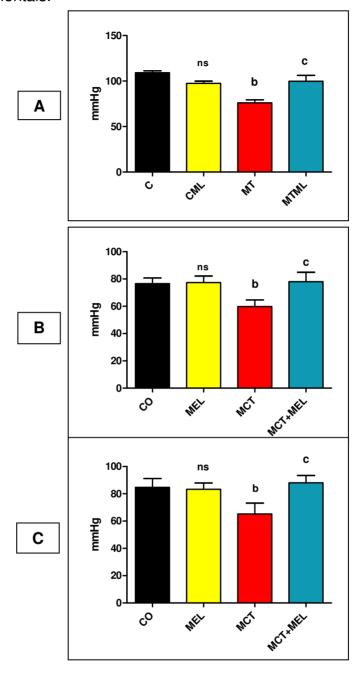


Figura 17. Pressão Arterial Sistólica (A), **Diastólica** (B) e **Média** (C) dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL). Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT, (ns) não significativo; (n = 5).

Nossos resultados estão de acordo com Ahmed *et al.*, (2014), os quais também encontraram redução nos valores da pressão arterial sistólica, diastólica e média em animais com HAP induzida por monocrotalina.

Por outro lado, o tratamento com melatonina preveniu tais alterações pressóricas devido à ação cardioprotetora dessa substância garantindo, portanto, a manutenção de uma perfusão tecidual adequada ao grupo MCT+MEL.

A figura 18 apresenta os valores ventriculares da Dpdt-max e da Dpdt-min, permitindo a avaliação das funções sistólica e diastólica ventriculares, respectivamente.

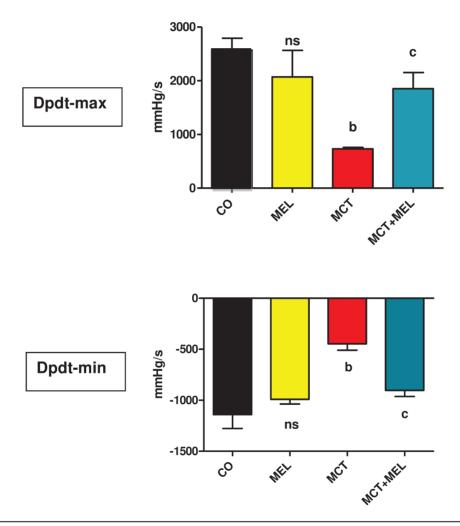


Figura 18. Máxima dP/dt e **Mínima Dpdt** dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MELResultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT, (ns) não significativo; (n = 5).

A figura 19 apresenta os dados relativos ao índice Tau, o qual se aplica à propriedade lusitrópica ventricular.

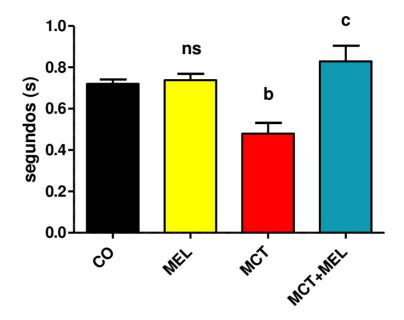


Figura 19. Índice TAU dos ratos dos grupos controle (CO), controle melatonina (MEL), monocrotalina (MCT) e monocrotalina + melatonina (MCT+MEL) Resultados expressos como média ± desvio padrão. ANOVA seguida de Tukey; (p < 0,05): (a) CO X MEL, (b) CO X MCT, (c) MCT+MEL X MCT, (ns) não significativo; (n = 5).

Observamos no presente trabalho que tanto a atividade sistólica (Dpdt-max) quanto à diastólica (Dpdt-min) foram significativamente prejudicadas no grupo MCT devido à ação deletéria da hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina ao coração, com comprometimento, também, da capacidade de relaxamento do músculo cardíaco (Tau). Tais fatores foram determinantes para a redução da pressão arterial média prejudicando, consequentemente, a perfusão tecidual dos animais do grupo MCT.

Nossos resultados estão de acordo com Akhavein *et al.*, (2007), os quais verificaram redução tanto da função sistólica ventricular esquerda (Dpdt max) quanto da função

diastólica (Dpdt min), em ratos com hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. Os autores consideraram que o prejuízo na função ventricular foi devido à ação tóxica direta da monocrotalina no tecido cardíaco, promovendo infiltração inflamatória e estreitamento do diâmetro interno das artérias coronárias prejudicando, dessa forma, o fluxo sanguíneo ao miocárdio. Esses resultados são semelhantes aos observados em nosso experimento, como discutido anteriormente. Além do efeito tóxico direto, a hipertensão arterial sistêmica ou pulmonar, através das suas diversas repercussões no sistema cardiovascular, contribuiu também de forma significativa para o prejuízo da função diastólica do ventrículo esquerdo verificada no grupo MCT.

Entretanto, o tratamento com melatonina preservou as propriedades inotrópicas e lusitrópicas ventriculares permitindo, provavelmente, um melhor débito cardíaco, refletindo na manutenção dos valores pressóricos arteriais próximos da normalidade.

V. CONCLUSÃO

A administração de monocrotalina aumentou acentuadamente o estresse oxidativo repercutindo em alterações estruturais e bioquímicas que comprometeram o funcionamento do sistema cardiovascular desses animais. Tais fatos ocorreram tanto pela ação tóxica direta da monocrotalina no tecido cardíaco, quanto pelas consequências decorrentes da hipertensão arterial pulmonar induzida por esse alcaloide.

Por outro lado, o tratamento com melatonina, aumentando as defesas enzimáticas antioxidantes, atenuou os efeitos deletérios sobre o sistema cardiovasculares induzidos, tanto pela ação direta da monocrotalina quanto pelas alterações secundárias à hipertensão arterial pulmonar promovida por esse alcalóide. Assim, melatonina pode representar uma nova abordagem terapêutica no tratamento da hipertensão arterial pulmonar.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1. Abete P, Bianco S, Calabrese C, Napoli C, Cacciatore F, Ferrara N, Rengo F. Effect of melatonin in isolated rat papillary muscle. **FEBS Letters**. 1997; 412: 79-85.
- 2. Acikel M., Emin M. *et al.* Protective effects of melatonin against myocardial injury induced by isoproterenol in rats. **J. Pineal Res**. 2003; 35:75–79.
- Ahmed, L.A., Obaid, A.A.Z., Zaki, H.F. and Agha, A.M. Naringenin adds to the protective effect of L-arginine in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats: Favorable modulation of oxidative stress, inflammation and nitric oxide.
 European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014; 62: 161–170.
- 4. Anker SD, Coats AJ. Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. **Chest.** 1999; 115:836-47.
- Akhavein F., St.-Michel E.J., Seifert E., Rohlicek C.V. Decreased left ventricular function, myocarditis, and coronary arteriolar medial thickening following monocrotaline administration in adult rats. J Appl Physiol. 2007 103:287-295.
- Anwar MM, Meki AR, Rahma HH. Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators. Comp Biochem Physiol CToxicol Pharmacol 2001; 130(3):357-67.
- Antolin I, Rodriguez C, Sainz R M, Mayo J C, Uria H, Kotler M L, Rodriguez-Colunga M J, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. FASEB J 1996; 10: 882-890.
- 8. Alpert JS, Thygesen K, Jaffe A, White HD. The universal definition of myocardial infarction: a consensus document: ischaemic heart disease. **Heart.** 2008 Oct; 94(10): 1335-41

- 9. Bal, E.; Ilgin, S.; Atli, O. et al. The effects of gender difference on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. Human and Experimental Toxicology, 2013: 32(7) 766–774.
- 10. Baltatu O, Afeche SC, Dos Santos SHJ, Campos LA, Barbosa R, Michelini LC, Bader M, Cipolla-Neto J. Locally synthesized angiotensin modulates pineal melatonin generation. J Neurochem. 2002; 80: 328-334.
- 11. Barreto A C. Avaliação não invasiva de pacientes com hipertensão arterial pulmonar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2005; v 85: 147-154.
- 12. Baydas G, Reiter, R J, Nedzvetskii V S, Nerush P A, and Kirichenko S V. **J Pineal Res.** 2002; 33, 134-139.
- 13. Barlow-Walden L R, Reiter R J, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen L D, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem Int.** 1995; 26: 497-502.
- 14. Bossone E, Butera G, Bodini BD, Rubenfire M. The interpretation of the electrocardiogram in patients with pulmonary hypertension: the need for clinical correlation. **Heart J.** Dec. 2003; 4(12): 850-4.
- 15. Brydon L, Roka F, Petit L, De Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan P J, Nanoff C, Strosberg A D, Jockers R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 proteins. **Mol Endocrinol** 1999; 13: 2025-2038.
- 16. Brodde O E & Michel M C., Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. **Pharmacol Ver.**, 1999; 51 (4): 651-689.
- 17. Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C., Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. **J Cardiovasc Pharmacol**., 1998; 31: 108-115.

- 18. Bruner L H, Hilliker K S, Roth R., Pulmonary Hypertension and ECG changes from monocrotaline pyrrole in the rat. **Am J Physiol**., 1983; H300-H306.
- 19. Bromme HJ, Morke W, Peschke D, Ebelt H, Peschke D: Scavenging effect of melatonin on hydroxyl radicals generated by alloxan. **J Pineal Res** 29: 201-208, 2000.
- 20. Cabrini F P H. Implantação do modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina em ratos: avaliação eletrocardiográfica.2009.http://libdigi.unicamp.br/document/code=000443360
- 21. Campos, L.A., Cipolla-Neto, J., Michelini, L.C. Melatonin modulates baroreflex control via area postrema. Brain and Behavior 2013; 3(2): 171–177.
- 22. Capsoni S, Viswanathan M, De Oliveira A M, Saavedra J M. Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the circle of Willis. **Endocrinology**. 1994; 135: 373-378.
- 23. Chen E P, Akhter S A, Bittner H B, Koch W J, Davis R D, Trigt P V., Molecular and funcional mechanisms of right ventricular adaptation in chronic pulmonary hypertention. **Ann Thorac Surg**., 1999; 67: 1053-1058.
- 24. Chen TH, Chen KH, Wang JJ. Preischemic treatment with melatonin attenuates liver reperfusion-induced impairment of cardiac function.

Transplant Proc. 2012 May; 44(4): 970-3.

25. Chen S J, Chen Y F, Opgenorth,T J, Wessale J L, Meng Q C, Durand J, DiCarlo, V S, Oparil S., The orally active nonpeptide endothelin A-receptor antagonist A 127722 prevents and reverse hypoxia-induced pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in sprague-dawley rats. J Cardiovasc Pharmacol., 1997; 29(6): 713-725.

- 26. Chen L, Gan X T, Haist J V, Feng Q, Lu X, Chakrabarti S, Karmazyn M., Attenuation of compensatory right ventricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na-H Exchange inhibitor cariporide. J Pharmacol and Experimental Therapeutics. 2001; 298 (2): 469-476.
- 27. Cheeke P.R., A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pirrolizidine alkaloids.

 Vet. Human Toxicol. 1994; 36:240-247.
- 28. Cheeke P.R. Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants. 2nd ed. Interstate, Danville, Illinois. 1998; 479p.
- 29. Chu V, Otero JM, Lopes O, Morgan JP, Amende I and Hampton PG Method non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. **BMC Physiology**, 2001; 1: 1-12.
- 30. Costa, E.J.X.; Lopez, R.H.; Lamy-Freund, M.T. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. **J Pineal Res**. 1995; v.19, p.123-126.
- 31. Costa ECS, Gonçalves AA, Areas MA, Morgabel RGB. Os efeitos da metformina sobre a dispersão do intervalo QT e QTc de ratos diabéticos. **Arq Bras Cardiol** 2008; 90(4): 232-238.
- 32. Coats A J S, Adamapolus S, Radelli A, McCance A, Meyer T E, Bernardi L, Solda P L, Davey P, Ormerod O, Forfar C, Conway J, Sleight P. Controlled trail the physical training in heart failure. **Circulation** 1992; 85: 2119-31.
- 33. Collinson, P.O. et al. Measurement of cardiac troponins. **Annals of Clinical Biochemistry** 2001, v.38, n.5, p.423-449.
- 34. Das R, Balonan L, Ballard HJ, Ho S, Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery. **International Journal of Cardiology** 2008; 340-345.

- 35. Demuro R L, Nafziger A N, Blask D E, Menhinick A M, Bertino J S JR: The absolute bioavailability of oral melatonin. **J Clin Pharmacol.** 2000; 40: 781-784.
- 36. DiFrancesco, D and Tortora, P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. **Nature**. 1991 May 9;351(6322):145-7.
- 37. Dhein S, Giessler C, Hoffmann I H, Leineweber K, Seypharth t, Brodde O E, Changes in α-1 adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. **Naun Sch Arch Pharmacol**. 2002; 365: 87-95.
- 38. Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF., Molecular basis of transient outward potassium current down regulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. **Circulation.** 1998; Oct 6; 98 (14):1383-93.
- 39. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Reiter RJ, Melatonin and Cardiovascular Disease: Mith or Reality. **Rev Esp Cardiol.** 2012; 65 (3):215–218.
- 40. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Sanches JJ, Kaski JC, Reiter RJ. Melatonin and circadian biology in human cardiovascular disease. **J Pineal Res** 2010; 49:14-22.
- 41. Dubocovich ML, Cardinali DP, Guardiola-Lemaitre B, Hagan RM, Krause DN, Sugden D, Vanhoutte PM, Yocca FD: Melatonin receptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification. **IUPHAR Media**, London, 1998; pp 187-193.
- 42. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J., International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. 2010, **Pharmacol Rev**. 62: 343-380.

- 43. Duncan M J, Takahashi J S, Dubocovich M L. Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125l]iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. **Endocrinology.** 1989; **125**: 1011-1018.
- 44. Eggers KM, Lind L, Venge P, Lindahl B. Factors Influencing the 99th Percentile of Cardiac Troponin I Evaluated in Community-Dwelling Individuals at 70 and 75 Years of Age. Clinical Chemistry 2013, 59:7 1068–1073.
- 45. Ersain M, Sehirli O, Toklu HZ, Suleymanoglu S, Alturfan EE, Yarat A., Melatonin improves cardiovascular function and ameliorates renal, cardiac and cerebral damage in rats with renovascular hypertension. **J Pineal Res.** 2009; 47: 97-106.
- 46. Ekmekcioglu C, Haslmayer P, Philipp C, Mehrabi MR, Glogar HD, Grimm M, Leibetseder VJ, Thalhammer T, Marktl W: Expression of the MT1 melatonin receptor subtype in human coronary arteries. **J Recept Signal Transduct Res**. 2001; 21: 85-91.
- 47. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi M R, Glogar H D, Holzenbein T H, Markovic O, Leibetseder V J, Strauss-Blasche G, Marktl W. The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. **J Pineal Res**. 2003; 35: 40-44.
- 48. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: Biological role and clinical relevance. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2006 April; 60 (3); 97-108.
- 49. Etienne Y, Jobic Y, Frachon I, Fatemi M, Castellant P, Quintin-Roué I. Mitral and aortic valvular disease associated with benfluorex use. **J Heart Valve Dis**. 2011 May; 20(3):348-50.
- 50. Favret F, Henderson K K, Allen J, Richalet J P, Gonzalez N C. Exercise training improves lung gas exchange and attenuates acute hypoxic pulmonary hypertension

- but does not prevent pulmonary hypertension of prolonged hypoxia. **J Appl Physiol.** 2001; 100: 20-25.
- 51. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Med.** 2006; 36(4):327-58. Review.
- 52. Folino AF, Bobbo F, Schiraldi C, Tona F, Romano S, Buja G, Bellotto F., Ventricular arrhythmias and autonomic profile in patients with primary pulmonary hypertension. **Lung.**, 2003; Nov-Dec;181(6):321-8.
- 53. Fonseca E. Skin manifestations of toxic syndrome due to denatured rapeseed oil.

 Actas Dermosifiliogr. 2009 Dec;100(10):857-60.
- 54. Forman K, Vara E, Garcia C, Kireev R, Cuesta S, Acuna-Castroviejo D, Tresguerres JAF. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in murine model of accelerated aging. **J Pineal Res.** 2010; 49: 312-320.
- 55. Furchgott RF & Zawadzki JV., The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth by acetylcholine. **Nature**. 1980; 288: 373-376.
- 56. Geary GG, Duckles SP, Krause DN. Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. **Br J Pharmacol** 1998; 123(8):1533-40.
- 57. Ghofrani H. A., Barst R. J., Benza R. L., Champion H. C., Fagan K. A., Grimminger F., Future Perspectives for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension J. Am. Coll. Cardiol., 2009; 54; S108-S117.
- 58. Girouard H, Chulak CH, Lejossec M, Lamontagne D, De Champlain J: Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**. 2001; 19: 1369-1377.
- 59. Girouard H, Chulak CH, Lejossec M, Lamontagne D, De Champlain J: Chronic antioxidant treatment improves sympathetic functions and β-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**. 2003; 21: 179-188.

- 60. Girouard H, Denault C, Chulak C, De Champlain J: Treatment by N-acetylcysteine and melatonin increases cardiac baroreflex and improves antioxidant reserve. **Am J Hypertens** 2004; 17: 947-954.
- 61. Gitto E, Tan D X, Reiter R J, Karbownik M, Manchester L C, Cuzzocrea S, Fulia F, Barberi I. Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. **J Pharm Pharmacol**. 2001; 53: 1393-1401.
- 62. Godoy M.F. Troponina como marcador de injúria celular miocárdica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 1998, v.71, n.4, p.629-633.
- 63. Gögenur I, Kücükakin B, Panduro Jensen L, Reiter RJ, Rosenberg J. Melatonin reduces cardiac morbidity and markers of myocardial ischemia after elective abdominal aortic aneurism repair: a randomized, placebo-controlled, clinical trial. **J Pineal Res**. 2014 Apr 8. doi: 10.1111/jpi.12138.
- 64. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Bogaard HJ, The monocrotalina model of pulmonary hypertension in perspective. **Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol**. 302:L363-L369, 2012.
- 65. Goret I, Reboul C, Tanguy S, Dauzat M, Obert P. Eur. J. Pharmacol 2005; 527: 121-128.
- 66. Gout B, Quiniou M J, Khandoudi N, Dantec C L, Saiag B., Impaired endothelium-dependent relaxation by adrenomedullin in monocrotaline-treated rat arteries. **Eur J Pharmacol.**, 1999; 380: 23-30.
- 67. Grossini E, Molinari C, Uberti F, Mary DASG, Vacca G, Caimmi PP. Intracoronary melatonin increases coronary blood flow and cardiac function through b-adrenoreceptors, MT1/MT2 receptors, and nitric oxide in anesthetized pigs. **J Pineal Res** 2011; 51:246–257.

- 68. Guimarães, J.I., Nicolau, J.E., Polanczyk, C.A., Pastore, C.A. Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. **Arq. Bras. Cardiol.** 2003. 80 (sup. II): 1-18.
- 69. Guimarães, JI. Diagnóstico, Avaliação e Terapêutica da Hipertensão Pulmonar **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2005; 1-182.
- 70. Hardeland R, Pandi-Perumal S R. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. **Nutrition & metabolism**, 2005; 20-22.
- 71. Henkens IR, Mouchaers KT, Vliegen HW, van der Laarse WJ, Swenne CA, Maan AC, et al., Early changes in rat hearts with developing pulmonary arterial hypertension can be detected with three-dimensional electrocardiography. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2007; 293:H1300-7.
- 72. Henkens IR, Mouchaers KT, Vonk-Noordegraaf A, Boonstra A, Swenne CA, Maan AC, et al. Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular pressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging., **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2008; 294:H2150-7.(A).
- 73. Henkens IR, Scherptong, RWC, van Kralingen, KW, Said, SAM, Vliegen, H.W., Pulmonary hypertension: the role of the Electrocardiogram. **Neth Heart J**. 2008; 16:250-4. (B).
- 74. Hessel M H M, Steendijk P, Adel B d, Scutte C I, Laarse A v d., Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2006; 291: H2424-H2430.
- 75. Hoelz C, Negri EM, Lichtenfels AJ, Conceção GM, Barbas CS, Saldiva PH, Capelozzi VL., Morphometric differences in pulmonary lesions in primary and

- secondary ARDS. A preliminary study in autopsies. **Pathol Res Pract.**, 2001; 197(8):521-30
- 76. Hongo M, Mawatari E, Sakay A, Ruan Z, Koizumi T, Terasawa F, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U, Shibamoto T., Effects of nicorandil on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **J Cardiovasc Pharmacol**., 2005; 46: 452-458.
- 77. Hunsinger RN¹, Wright D. A characterization of the acute cardiopulmonary toxicity of fenfluramine in the rat. **Pharmacol Res.** 1990 May-Jun; 22(3):371-8.
- 78. Ito K., Hayashi K., Nakashima T., Murakami T. Alteration of fate of vasoactive autacoids in pulmonary circulation following monocrotaline-induced lung vascular injury in rats. **Br J Pharmacol**. 1988; August; 94(4): 1167–1174.
- 79. Ito K M, Sato M, Ushijima K, Nakai M, Ito K. Alterations of endothelium and smooth muscle function in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2000; 279: H1786-H1795.
- 80. Ivo R. Henkens, Koen T. B. Mouchaers, Anton Vonk-Noordegraaf, et al. Improved ECG detection of presence and severity of right ventricular mpressure load validated with cardiac magnetic resonance imaging. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2008; 294: H2150–H2157.
- 81. Ishikawa K, Hashimoto H, Mitani S, Toki Y, Okumura K, Ito T. Enalapril improves heart failure induced by monocrotaline without reducing pulmonary hypertension in rats: roles of preserved myocardial creatine kinase and lactate dehydrogenase isoenzimes. Int. J. Cardiol. 1995; 47: 225-233.
- 82. Ianas O, Olinescu R, Badescu I. Melatonin involvement in oxidative processes. **Endocrinologie** 1991; 29: 147-153.

- 83. Kalsbeek A, Garidou ML, Palm IF, Van Der Vliet J, Simonneaux V, Pevet P, Buijs RM: Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. **Eur J Neurosci**., 2000: 12: 3146-3154.
- 84. Kääb Galiè N, Rubin LJ, eds. Pulmonary arterial hypertension. Epidemiology, assessment, and therapy. **JACC.** 2004; 43(Suppl S):1S-90S.
- 85. Kanno S, Wu Y, Lee P C,Billiar T R, Ho C. Angiotensin-converting inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide sinthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Circulation** 2001; 104: 945-950.
- 86. Karliner JS, Sarnquist FF, Graber DJ, Peters RM Jr., West JB., The electrocardiogram at extreme altitude: experience on Mt. Everest. **Am Heart J**., 1985; 109:505-13.
- 87. Kennaway DJ and Voultsios A: Circadian rhythm of free melatonin in human plasma.

 J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83: 1013-1015.
- 88. Kiran T R, Subramanyam M V V, Devi S., Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. **Comparative Bioch and Phisiol** Part B., 2004; 137: 187-196.
- 89. Klein DC, Sugden D, Weller JL: Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. **Proc Natl Acad Sci** USA 1983; 80: 599-603.
- 90. Kim H.Y., Stermitz F.R., Wilson D.W., Taylor D. & Coulombe Jr R.A. Characterization of pyrrolizidine alkaloids-induced DNA-protein cross-link. Carcinogenesis 1993; 16:2691-2697.

- 91.Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen VP, Schott P, Brodde OE, and Hasenfuss G., Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. **Circ Res.** 2003; 93: 230–237.
- 92. Kokkola T, Vaittinen M, Laitinen J T. Inverse agonist exposure enhance ligand biding and G protein activation of the human MT1 melatonin receptor, but leads to receptor down-regulation. **J Pineal Res**. 2007 Oct; 43(3): 255-262.
- 93. Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen van P, Schott P, Brodde OE & Hasenfuss G. Mechanical loaddependent regulation of gene expression in monocrotalineinduced right ventricular hypertrophy in the rat. **Circ Res 2003**, 93, 230–237.
- 94. Kumar S, Kela AK, Mehta VL and Shukla AK., Preferred anesthetics agents in experimental cardiology: a study on rat electrocardiogram. **Ind. J. Pharmacol.** 1995; 23: 127-129.
- 95. Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW, Parmer RJ. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension: role of heredity, gender, and ethnicity. **Hypertension** 2000; 36:878–884.
- 96.Lamberts R R, Vaessen R J, Westerhof N, Stienen G J M., Right ventricular hypertrophy causes impairment of left ventricular diastolic function in the rat. **Basic Res Cardiol**. 2007; 102: 19-27.
- 97. Larsson, H.P. How is the heart rate regulated in the sinoatrial node? Another piece to the puzzle. **J. Gen. Physiol.** 2010; Vol. 136 No. 3 237–241
- 98. Lee J, Reich R, Xu F, Shegal PB., Golgi, trafficking, and mitosis dysfunctions in pulmonary arterial endothelial cells exposed to monocrotalina pyrrole and NO scavenging. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2009: 297: L715-L728.

- 99. Lewis M, Fladers S. Mechanism of melatonin-induced vasoconstriction in rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction. **Br J Pharmacol**. 1999; 126:1408-18.
- 100. Liao Z, Lockhead D, Larson ED, Proenza C. Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. **J Gen Physiol.** 2010 Sep;136(3):247-58
- 101. Liao Z, St Clair JR, Larson ED, Proenza C. Myristoylated peptides potentiate the funny current (I(f)) in sinoatrial myocytes. . **Channels** (Austin). 2011 Mar-Apr; 5(2): 115-9.
- 102. Lourenço A P, Albuquerque R R, Silva C B, Faria B, Wieland J, Coelho T H, Pinto J C, Moreira A F L., Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling em left ventricle of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Am J Psysiol Heart Circ Physiol.**, 2006; 291: 1587-1594.
- 103. Lourenço, A. P., Vasques-Nóvoa, F., Fontoura, D. et al. A Western-Type Diet Attenuates Pulmonary Hypertension with Heart Failure and Cardiac Cachexia in Rats. **J. Nutr.** 141: 1954–1960, 2011.
- 104. Luz P L, Laurindo F R M e Chagas A C P. *Endotélio:* doenças cardiovasculares. 2003.
- 105. Maarman G J, Blauwet L, Blackhurst D, Sliwa K, Lecour S. Cardioprotective effect of melatonin on cardiac function and oxidative status in pulmonary arterial hypertension. **Cardiovasc Res**. 2014 Jul 15;103 Suppl 1:S90
- 106. Macchi M M, Bruce J N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Neuroendocrinal**. 2004, Sep-Dec; 25(3-4): 177-195.
- 107. Machado C, Brito I, Souza D, Correia LC. Etiological frequency of pulmonary hypertension in a reference outpatient clinic in Bahia, Brazil. **Arq Bras Cardiol**. 2009 Dec; 93(6): 629-36, 679-86.

- Marleen H. M. Hessel, Paul Steendijk, Brigit den Adel, Cindy I. Schutte, and Arnoud van der Laarse., Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 291: H2424–H2430.
- 109. Malpaux B, Skinner D C, Maurice F. The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. **J Neuroendocrinol** 1995; **7**: 199-206.
- 110. Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. **J Biol Rhythms**. 2001; 16: 336-347.
- 111. Mark L R, Chad M T, Christian A O, Thai V, Kenneth GP. Clinical Applications of Heart Rate Variability in the Triage and Assessment of Traumatically Injured Patients. **Anesthesiol Res Pract**, 2011:1-8.
- 112. Martins, C. S. Troponina: estrutura, fisiopatologia e importância clínica para além da isquemia miocárdica. Arquivos de Medicina, 2009, 23 (6): 221-40.
- 113. Masana M I, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul W M, Duckles S P, Dubocovich M L, Krause D N. MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. J Pharmacol Exp Ther. 2002; 302: 1295-1302.
- 114. Mattocks A R. Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. AcademicPress. London. 1986; 393p.
- 115. Mawatari E, Hongo M, Sakai A, Terasawa F, Takahashi M, Yazaki Y, Kinoshita O, Ikeda U., Amlodipine prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and prolongs survival in rats independent of blood pressure lowering.

 Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007; 34(7):594-600.

- 116. McLaughlin V V & McGoon M D., Pulmonary arterial hypertension. **Circulation**. 2006; 114: 1417-1431.
- 117. McGoon M, Gutterman D, Steen V, Barst R, McCrory DC, Fortin TA, et al., Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. **Chest** 2004; 126:14S-34S.
- 118. Mereles D, EHlken N, Kreuscher S, Ghofani S, Hoeper M. M. Exercise and respiratory exercise improve capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. **Circulation**. 2006; 114:1482-89.
- 119. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yanu M, Yamaguchi I, Sugishita Y, Goto K., Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocotaine-induced pulmonary hypertension. **Circ Res**., 1993; 73: 887-897.
- 120. Mohammadi, S., Najafi, M., Hamzeiy, H. et al. Protective Effects ofMethylsulfonylmethane on Hemodynamics and Oxidative Stress in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. Adv. Pharmaco.I Sci. Volume 2012, Article ID 507278, 6 pages
- 121. Morita K M D, Ogawa Y M D, Tobise K M D., Effect of endothelium of pulmonary artery vasoreativity in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **Jpn Circ J**., 1996; 60: 585-592.
- 122. Moore RY: Neural control of the pineal gland. **Behav Brain Res** 1996; 73: 125-30.
- 123. Mor M, Plazzi PV, Spadoni G, Tarzia G: Melatonin. **Curr Med Chem**. 1999; 6: 501-518.
- 124. Nelson C S, Marino J L, Allen C N. Melatonin receptors activates heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. **Neuroreport** 1996; 7: 717-720.

- 125. Newby AC, Zalstsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. J Pathol. 2000; 190:300-309.
- 126. Newman J H, Robbins I M., Exercise training in pulmonary hypertension: implications for the ecaluation of drugs trial. **Circulation**. 2006: 1448-1449.
- 127. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Helin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrand P, Canet E, Boutin JA., Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone redutase 2. **J Biol Chem**. 2000; 275: 31311-31317.
- 128. Nishiyama K, Yasue H, Moriyama Y, Tsunoda R, Ogawa H, Yoshimura M & Kugiyama K. Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. **Am Heart J**. 2001; 141, E9.
- 129. Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J Pineal Res**. 1999; 27: 159-163.
- 130. Nussinovitch U, Elishkevitz KP *et al.* Reliability of Ultra-Short ECG Indices for Heart Rate Variability. **Ann Noninvasive Electrocardiol** 2011; 16(2):117–122.
- 131. O'brien P.J. Differential reactivity of cardiac and skeletal muscle from various species in a cardiac troponin I immunoassay. **Clinical Chemistry 1997**, v.43, n.12, p.2333-2338.
- 132. Oriowo M A, Chandrasekhar B, Kadavil E., α 1 adrenoceptor subtypes mediating noradrenaline-induced contraction of pulmonary hypertensives rats. **Eur J Pharmacol**., 2003; 482: 255-263.
- 133. OYAMA, M.A.; SISSON, D.D. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 2004, v.18, n.6, p. 831-839.

- 134. Pan L, Fu JH, Xue XD, Xu W, Zhou P, Wei B. Melatonin protects against oxidative damage in a neonatal rat model of bronchopulmonary dysplasia. **World J**Pediatr. 2009 Aug; 5(3): 216-21.
- 135. Pappolla M A, Poeggeler B, Reiter R J. La hipótesis oxidativa en la enfermedad de Alzheimer. Papel de la melatonina como antioxidante y como agente antibeta amiloide. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, 2001; v.8, p.8-19.
- 136. Patel, V., Upaganlawar, A., Zalawadia, R., Balaraman, R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. **Eur. J. Pharmacol**, 2010: 644 160–168
- 137. Paulin, R. and Michelakis, E.D. The Metabolic Theory of Pulmonary Arterial Hypertension. 1130. **Circ Res.** 2014; 115:148-164.
- 138. Pelá G, Missale C, Raddino R, Condorelli E, Spano P F, Visioli O J., β- 1 and β-2 Receptors are differentially desensitized in the experimental model of heart failure. Cardiovasc Pharmacol. 1990; 839-846.
- 139. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, Marcheselli F. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. **Life Sci**. 1994; 55: PL271-PL276.
- 140. Pogan L, bissonnette P, Parent L, Sauve R: The effects of melatonin on Ca2+ homeostasis in endothelial cells. **J Pineal Res**. 2002; 33: 37-47.
- 141. Post J M, Hume J R, Archer S L, Weir K., Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Cell Physiol**. 1992; 31: C882 890.
- 142. Pumprla J, Howorka K, Groves D, Chester M, Nolan J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **Int J Cardiol.** 2002; 84:1-14.

- 143. Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. **Clin Chest Med**. 2001; 22:433-449.
- 144. Rabinovitch M. Pulmonary hypertension: pathophysiology as a basis for clinical decision making **J Heart Lung Transpl**. 1999; 18:1041-1052.
- 145. Rajendra AU, Paul JK, Kannathal N, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. **Med Bio Eng Comput** 2006; 44(12): 1031-51.
- 146. Ray C.A. Melatonin attenuates the sympathetic nerve responses to orthostatic stress in humans. **J Physiol.**, 2003; 551.3 pp. 1043-1048.
- 147. Reiter RJ, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Tan D-X. Cardiac hypertrophy and remodeling: pathophysiological consequences and protective effects of melatonin. J Pineal Res. 2010; 28 (Suppl 1): S-7-S12.
- 148. Reiter RJ, Tan D-X, Paredes SD, Fuentes-Broto L, Beneficial effects in cardiovascular disease. **Ann Med** 2010; 42: 276-285.
- 149. Reiter RJ, Tan D-X. Melatonin and cardiac pathophysiology. **Heart Met**. 2009; 44: 97-106.
- 150. Reiter R.J. Antioxidant actions of melatonin. Adv Pharmacol 1997; 38:103-17.
- 151. Reiter R J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. **Endocr Rev**. 1991; 12: 151-180.
- 152. Reiter RJ, Ortiz GG, Monti MG, Carneiro RC: Cellular and Molecular Actions of Melatonin as an Antioxidant. **Horm Res. Basel, Karger**, 1997, vol 23, pp 81-88.
- 153. Reiter R J, Tan D X, Ouna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal Biomed Science**. 2000a; (7): 444-458.
- 154. Reiter RJ, Tan DX, Paredes SD, Fuentes-Broto L. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. **Ann Med** 2010; 42:276–285.

- 155. Reiter R J, Tan D X, QI W, Manchester L C, Karbownik M, Calvo J R. Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. **Biological Signals and Receptors.** 2000b; (9): 160-171.
- 156. Reiter R J, Tan D X, Manchester L C, Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. **Cell biochemistry and biophysics.** 2001; 34(2): 237-56.
- 157. Reiter, R.J., Tan, D. X.; Sainz, R. M.; Mayo, J. C.; Lopez-Burillo, S. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. **J. Pharm. and Pharmacol**. 2002; 54: 1299-1321.
- 158. Reiter RJ, et al. Medical implications of melatonin: receptors-mediated and receptors-independent actions. **Adv. Med. Sci.** 2007; 52: 11-28.
- 159. Reiter RJ, Manchester LC, Fuentes-Broto L, Tan D-X. Cardiac hypertrophy and remodelling: pathophysiological consequences and protective effects of melatonin. J Hypertens 2010; 28 (Suppl 1):S7–S12.
- 160. Reppert, S. M.; Weaver, D. R.; Ebisawa, T. Cloning and characterization of mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses.
 Neuron, 1994; 13(5): 1177-1185.
- 161. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mawe CD, Kolakwski LF. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. **FEBS Letters** 1996; 386 (2-3): 219-224.
- 162. Ribelayga C, Pevet P, Simonneaux V: Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. **Brain Res** 1997, 777: 247-501.

- 163. Rich, J.D., Thenappan, T., Freed B., et al. QTc prolongation is associated with impaired right ventricular function and predicts mortality in pulmonary hypertension.

 Int J Cardiol. 2013 Aug 10;167 (3):669-76.
- 164. Riera A.R.P. *et al.*, Diretrizes da Sociedade Brasileira sobre analyses e emissão de laudos eletrocardiográficos. **Arq Bras Cardiol.** 2009; 93 (3 supl.2): 1-19
- 165. Rodella LF, Favero G, Rossini C, Foglio E, Bonomini F, Reiter RJ, Rezzani R. Aging and vascular dysfunction: beneficial melatonin effects. **Age (Dordr)** 2011.
- 166. Rosenberg H. C. e Rabinovitch M., Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 1988; 255: H1484 H1491.
- 167. Ryan J.J. and Archer S.L. The Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension. Disorders of Metabolism, Angiogenesis and Adrenergic Signaling in Right Ventricular Failure. Circ Res. 2014;115:176-188.
- 168. Sahna E, Parlakpinar H, Ozturk F, Cigremis Y, Acet A. The protective effects of physiological and pharmacological concentrations of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Urol Res**. 2003; 31: 188-93.
- 169. Schott P, Singer SS, Kogler H, Neddermeier D, Leineweber K, Brodde OE, Regitz-Zagrosek V, Schmidt B, Dihazi H, and Hasenfuss G., Pressure overload and neurohumoral activation differentially affect the myocardial proteome. **Proteomics**, 2005; 5: 1372–1381.
- 170. Said, Sami I., Mediators in modulators of pulmonary hypertension. **Am J Physiol** Cell Mol Physiol., 2006; 291: L547-L558.
- 171. Santos JCA, Riet-Correa F, S, Simões SVD, Barros SL. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras**. 2008; 28(1): 1-14, janeiro.

- 172. Sanches-Hidalgo M, et al., Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rats during physiological aging. **J Pineal Res**. 2009; 46: 29-35.
- 173. Sanches-Hidalgo M, Alarcon de la Lastra C, Carrascosa-Samoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, Guerrero JM. Age-related changes in Melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. **Exp. Gerontol.** 2009; 44, 328-334.
- 174. Sanyal S N, Ono K., Derangement of autonomic nerve control in rat with right ventricular failure. **Pathophysiology**, 2002; 8: 197-203.
- 175. Sanyal, S., Wada, T., Yamabe, M. et al. Cardiac autonomic nerve abnormalities in chronic heart failure are associated with presynaptic vagal nerve degeneration.

 Pathophysiology, 2012(19):253–260.
- 176. Sap F., Karataz, Z., Itin, H. et al. Dispersion durations of P-wave and QT interval in children with congenital heart disease and pulmonary arterial hypertension. **Pediatr Cardiol.** 2013 Mar; 34(3): 591-6.
- 177. Sehirli, A.O., Koyun, D., Tetik, S. et al. Melatonin protects against ischemic heart failure in rats. **J. Pineal Res**. 2013; 55: 138-148.
- 178. Seyfarth T, Gerbershagen H P, Giessler C, Leineweber K, Hoffmann I H, Ponicke K, Brodde O E., The cardiac β adrenoceptor- G-protein(s)-adenylyl cyclase system in monocrotaline-treated rats. **J Mol Cell Cardiol**. 2000; 32: 2315-2326.
- 179. Sewerynek E, Reiter R J, Melchiorri D, Ortiz G G, Lewinski A. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin.

 Hepatogastroenterology 1996; 43: 898-905.
- 180. Schermuly R T, Kreisselmeier K P, Ghofrani H A, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrat D, Seeger W, Grimminger

- F., Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Am J Respir Crit Care Med.**, 2004; 169:39-45.
- 181. Shibata S, Satake N, Takagi T, Usui H: Vasorelaxing action of melatonin in rabbit basilar artery. *Gen Pharmacol* 1989; **20**: 677-680.
- 182. Shinde, S.B. Relevant cardiac biochemical markers. **Bombay Hospital Journal 2004**, v.46, n.4.
- 183. Shubat P J, Bowers R J and Huxtable R J. Na⁺/K⁺ Adenosine Triphosphatase activity of pulmonary arteries after intoxication with the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline. **J Pharmacol Exp Ther**., 1989; 252: 70-76.
- 184. Simko F, Pechanova O. Potencial roles of melatonin and chronotheraphy among the new trends in hypertension treatment. J Pineal Res. 2009; 47: 127-133. Spinale FG, Gunasinghe H, Sprunger PD, Baskin JM, and Bradham WC., Extracellular degradative pathways in myocardial remodeling and progression to heart failure. J Card Fail. 2002; S332–S338.
- 185. St Clair JR, Liao Z, Larson ED and Proenza C. PKA-independent activation of I_f by cAMP in mouse sinoatrial myocytes. **Channels** 2013. 7:4, 318–321; July/August.
- 186. Steffen et al. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. **J Appl Physiol** 105: 1950–1958, 2008
- 187. Steinber G, Susan F., α 1-adrenergic receptor subtype function in cardiomyocytes: lessons from genetic models in mice. **J Mol Cell Cardiol**. 2002; 34: 1141-1145.
- 188. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Moon WJ, McMurtry IF,. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 2009; 297: L1013-L1032.

- 189. Sun X e Ku D.D., Selective right, but not left, coronary endothelial dysfunction precedes development of pulmonary hypertension and right heart hypertrophy in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**., 2005; 290: H758 H764.
- 190. Tagaya E, Tamaoki J, Kawatani K, Nagai A. Role of Na⁺-K⁺ ATPase in sodiumnitroprusside iduced relaxation of pulmomary artery under hypoxia. **Respiration**, 2001; 68: 186-191.
- 191. Tan D X, Manchester L C, Reiter R J; Qi W; Kim S J; El-Sokkary G H. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: prevention by melatonin. **Journal of pineal research** 1998; 25(3):184-91.
- 192. Tan D X, Manchester L C, Reiter R J, Plummer B F, Limson J, Weintraub S T, Qi W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation.

 Free radical biology & medicine. 2000: 29(11):1177-85.
- 193. Tan D X, Manchester L C, Burkhardt S, Sainz R M, Mayo J C, Kohen R, Shohami E, Huo Y S, Hardeland R, Reiter R J. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2001; 15(12):2294-6.
- 194. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, and Reiter RJ., Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. **Journal of pineal research**, 2007 Nov; 43 (4): 317-20.
- 195. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC et al. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biol Rev Camb Philos Soc** 2010; 85:607–623.

- 196. Tare M, Parkington HC, Wallace EM, Sutherland AE, Lim R, Yawno T, Coleman HA, Jenkin G, Miller SL. Maternal melatonin administration mitigates coronary stiffness and endothelial dysfunction, and improves heart resilience to insult in growth restricted lambs. **J Physiol.** 2014 Jun 15;592(Pt 12):2695-709.
- 197. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circulation**, 1996; 93(5): 1043-65.
- 198. Taylor D W, Wilson D W, Lamé M W, Dunston S D, Jones A D, Segall H J., Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 1997; 143: 196-204.
- 199. Tenganttini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, and Rezzani R., Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. **J Pineal Res**. 2008; 44: 16-25.
- 200. Thomas H C, Lamé M W, Dunston S K, Segall H J, Wilson D W., Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 1998; 151: 236-244.
- 201. Ting N, Thambyraja A, Sugden D, Scalbert E, Dela P, Wilson VG, Pharmacological studies on the inhibitory action of melatonin and putative melatonin analogues on porcine vascular smoth muscle. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 2000; 361: 327-333.
- 202. Tong CW, Gaffin RD, Zawieja DC & Muthuchamy M. Roles of phosphorylation of myosin binding protein-C and troponin I in mouse cardiac muscle twitch dynamics.
 J Physiol. 2004, 558, 927–941.

- 203. .Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res** 2011; 34:5–14.
- 204. Tuder RM et al. The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. **Clin Chest Med.,** 2001: 22:405-418.
- 205. Tuder RM, et al. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension, **Am J Pathol.** 1994; 144:275-285.
- 206. Turjanski AG, Estrin DA, Rosenstein RE, Mccormick JE, Martin SR, Pastore A, Biekofsky RR, Martorana V: NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin. **Protein Sci.** 2004; **13**: 2925-2938.
- 207. Uchino T, Shamarendra N. Sanyal NS, YAMABE M, KAKUI T, Takebayashi S, Shimaoka T, Shimada T, Noguchi T, and ONO, K., Rescue of Pulmonary Hypertension with an Oral Sulfonamide Antibiotic Sulfisoxazole by Endothelin Receptor Antagonistic Actions. **Hypertens Res**. 2008; Vol. 31, Nº. 9.
- 208. Usui S, Yao A, Hatano M, Kohmoto O, Takahashi T, Nagai R, Kinugawa K., Upregulated neurohumoral factors are associated with left ventricular remodeling and poor prognosis in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. **Circ J.** 2006 Sep; 70(9):1208-15.
- 209. Van der Laarse A., Hypothesis: troponin degradation is one of the factors responsible for deterioration of left ventricular function in heart failure. **Cardiovasc Res.** 2002, 56: 8–14.
- 210. Vaneček J, Pavlík A, Illnerová H: Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. **Brain Res**. 1987, 435: 359-362.
- 211. Vaneček J, inhibitory effect of melatonin on GnRH-induced LH release. **Review** of reproduction 1999, 4: 67-72.

- 212. Verzola, R M M, Mesquita R A, Peviane S, Ramos O H P, Moriscot A S, Perez S E A, Araújo H S S., Early remodeling of rat cardiac muscle induced by swiming training. **Braz J Med Biol Res**., 2006, 39(35): 621-627.
- 213. Viswanathan M, Laitinen J T, Saavedra J M: Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 6200-6203.
- 214. Vogel J, Morbius C, Kushinsky W, Rosblun WI. Early delineation of ischemic Tissue in Rat Brain cryosections by high-contrast staining. **Stroke**, **Journal of American heart Association**. 1999, 30 (5): 1134-41.
- 215. von Haehling S, Doehner W, Anker SD. Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure. **Cardiovasc Res**. 2007, 73:298–309.
- 216. Xiaowei Sun and David D. Ku., Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 2008, 294: H801–H809.
- 217. Xiaohong CL, Gan T, Haist JV, Feng Q, Lu X, Chakrabarti S, and Karmazyn M., Attenuation of compensatory right centricular hypertrophy and heart failure following monocrotaline-induced pulmonary vascular injury by the Na1-H1 exchange inhibitor cariporide. **Journal Phisiol. Exp. Ther**. 2001, 298:469–476.
- 218. Wang F, Li J, Wu C, Yang J, Xu F, Zhao Q: The GABAA receptor mediates the hypnotic activity of melatonin in rats. **Pharmacol Biochem Behav**., 2003, 74: 573-578.
- 219. Wensel, R., Jilek C., Dorr, M. et al. Impaired cardiac autonomic control relates to disease severity in pulmonary hypertension. **Eur Respir J**. 2009, 34: 895–901

- 220. Werchan P M, Summer W R, Gerdes A M, Mcdonough K H., Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Heart Circ Physiol**. 1989, 25: H1328-H1336.
- 221. Williams L M, Morgan P J. Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. **J Endocrinol**. 1988, 119: R1-R3.
- 222. Witt-Enderby P A, Dubocovich M L. Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells.

 Mol Pharmacol. 1996, 50: 166-174.
- 223. Wurtman RJ, Axelord J, Chu EW: The relation between melatonin, a pineal substance, and the effects of light on the rat gonad. **Ann N Y Acad Sci** 1964, 117: 228-230.
- 224. Wynne J, Braunwald E The cardiomyopathies and myocardites. In: Braunwald E (ed) Heart Disease: a Textbook of Cardiovascular **Medicine**, 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1997: 1404 -14.
- 225. Yan C C, Huxtable R J. Relationship between glutathione concentration and metabolism of the pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, in the isolated, perfused liver. **Toxicol Appl Pharmacol.**, 1995, 130 (1):132-9.
- 226. Yi, H-T., Hsieh, Y-C., Wu, T-J., et al. Heart rate variability parameters and ventricular arrhythmia correlate with pulmonary arterial pressure in adult patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Heart & Lung,** 2014: 1-7.
- 227. Yen-Chun Lai, Karin C. Potoka, Hunter C. Champion, Ana L. Mora and Mark T. Gladwin. Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. **Circ Res.** 2014, 115:115-130.

- 228. Zanichelli P G, Estrela H F G, Spadari-Bratfisch R C, Grassi-Kassisse D M, Franco D W. The effects of ruthenium tetraammine compounds os vascular smooth muscle. **Nitric oxide** 2007, 6: 189-196.
- 229. Zanichelli P G, Miotto A M, Estrela H F G, Soares F R, Grassi-Kassisse D M, Spadari-Bratfisch R C, Castellano E E, Roncaroli F, Parise A R, Olabe J A, de Brito A R, Franco D W., The [Ru(Hedta)Na] (0.1) System: structure chemical reactivity and biological assays. **J. Inorg. Biochem**. 2004, 98: 1921-1932.
- 230. Zhang, Y., Li, L., Xiang, C. et al. Protective effect of melatonin against Adriamycin-induced cardiotoxicity. Exp. Ther. Med., 2013, 5: 1496-1500.
- 231. Zuo L, Otenbaker NP, Rose BA, Salisbury KS. Molecular mechanisms of reactive oxygen species-related pulmonary inflammation and asthma. **Mol Immunol.** 2013, 56:57–63.
- 232. Zuo, L., Rose B.A., Roberts, W.J. et al. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in systemic and pulmonary hypertension. American Journal of Hypertension 2014, 27(5) May
- 233. Leineweber K, Seyfarth T, Brodde O E., Chamber-specific alterations of noradrenaline uptake (uptake1) in right ventricles of monocrotaline-treated rats.

 British J Pharmacol. 2000, 131: 1438-1444.
- 234. Leineweber K, Seyfarth T, Abraham G, Gerbershagen HP, Heinroth-Hoffmann I, Pönicke K, Brodde OE., Cardiac beta-adrenoceptor changes in monocrotaline-treated rats: differences between membrane preparations from whole ventricles and isolated ventricular cardiomyocytes. **J Cardiovasc Pharmacol**. 2003, 41(3):333-42.

Capítulo II

"MELATONINA REDUZ ALTERAÇÕES PULMONARES EM RATOS PORTADORES DE HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA"

MELATONIN REDUCES OXIDATIVE STRESS AND PULMONARY INJURY IN RATS WITH PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION INDUCED BY MONOCROTALINE

Authors:

1) Luiz Alberto Ferreira Ramos

e-mail: docdeto003@yahoo.com.br Biology Institute - Dept. Structural and Functional Biology University of Campinas – UNICAMP Brazil

2) Miguel Arcanjo Areas

e-mail: migarare@unicamp.br Biology Institute - Dept. Structural and Functional Biology University of Campinas – UNICAMP Brazil

Abstract.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a disease characterized by increased pulmonary vascular resistance, and impairs alveolar gas exchange and cardiac function. Melatonin has vasorelaxant action antioxidant activity at both physiological and pharmacological concentrations. The objective of this study was to evaluate the effect of melatonin on the lung artery contractile response, activity of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the lung samples, concentratios of malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation biomarker, and pulmonary histology in monocrotaline-induced rats. Male Wistar rats weighing approximately 250g were fed a commercial diet and water ad libitum in the Animal Department of Structural and Functional Biology of Institute of Biology - Unicamp, in a temperature of 20 ± 2 °C and light / dark cycle of 12:00. The animals were distributed into four experimental groups (n = 5): CO (control), MEL (melatonin), MCT (monocrotaline), MCT+MEL (monocrotaline plus melatonin). PAH was induced by administration of single dose of monocrotaline (60 mg / kg, i.p.) on the first day of the experiment. Melatonin (15 mg / kg, i.p.) was administered daily for 28 days trial period. The animals were euthanized by deep anesthesia (Ketamine 100 mg / kg + xylazine 7 mg / kg body weight, i.m.) was withdrawn from the pulmonary artery to obtain vascular rings in vitro, under stimulation of different concentrations of noradrenaline the presence or absence of melatonin (10⁻⁴M). Were also obtained, histological sections of lung tissue stained with hematoxylin-eosin for qualitative and quantitative analysis. The results showed that melatonin significantly reduced the contractile response of pulmonary artery in MCT+MEL group to maximum response of vascular reactivity to norepinephrine. Furthermore, melatonin increased enzymatic activity of the SOD, CAT, and GS-Px in lung and decreased MDA levels in the serum of PAH rats. Consequently, melatonin also increased the diameter of the pre-acinar artery and pulmonary alveolar area in MCT+MEL group. In conclusion, melatonin showed protective effect attenuating the deleterious effects oxidative damage of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline.

Key Words - Melatonin, pulmonary histology, monocrotaline, vascular reactivity, rats.

Background

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a clinical and hemodynamic syndrome, which results in increased vascular resistance in circulation, usually by blending mechanisms, involving vasoconstriction and remodeling of the arteriolar wall (9). PAH is characterized histopathologically by angioproliferative plexiform lesions of endothelial cells, proliferation and thickening of vascular smooth muscle cells, with an incidence of approximately two to five people / million per year. The relationship between the sexes is the ratio of two women / one man with 37 years old on average (29), survival rate at 1, 3 and 5 years receiving medical treatment, with 68%, 48% and 34%, respectively (35). In severe and untreated cases significant mortality has been observed in 2.5 years (34). Formation and remodeling of the mammalian heart involves a complex program of cell growth whose functional demand is offset by hyperplastic increase in ventricular size. Hypertrophy is established in response to increasing hemodynamic load on the body or in response to increased physiological demand.

The main factor related to the pathophysiology of PAH is endothelial dysfunction, with increased production and release of vasoconstrictors such as endothelin 1 (ET1) (10, 11), thromboxane A_2 (TX₂), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and consequent decreased production and release of vasodilator substances such as nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) and action of acetylcholine (ACh). In stage heart failure, PAH decreases the positive inotropic effect right heart (37), and there is an increased concentration of noradrenaline (NA), resulting in a reduction of the maximum response as a result of prolonged exposure to high concentrations cardiac receptors that neurotransmitter (38).

Thus, regulation of pulmonary vascular tone is multifactorial and involves a complex balance of vasoconstrictor and vasodilator factors, the release of growth of different cell types that interact with autocrine and paracrine pathways factors. Hypoxia is a key regulatory this interaction in the pulmonary vasculature and exposure to hypoxia leads to adaptive responses affecting all layers of the vascular wall lung (18). These results in pulmonary vascular remodeling leading to the development of pulmonary arterial hypertension (19). Although the etiology of PAH is diverse and multifactorial, the underlying pathophysiology are common among its various forms. Endothelial dysfunction, excessive pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation, hypertrophy, and migration, as well as various degrees of pulmonary vasoconstriction and inflammation, are major components of the pathobiology of PAH and therefore represent important targets for current therapies. Vasodilator therapies

such as prostacyclin (PGI₂), endothelin (ET-1) receptor antagonists, and phosphodiesterase-5 (PDE-5) inhibitors, either separate or in combination, are variably successful in slowing PAH progression and prolonging survival (24).

Melatonin produced by the pineal gland has been studied to be involved in the regulation of the cardiovascular system (1, 29) in vascular smooth muscle and hence systemic blood pressure (2, 3). This is due to the presence of membrane receptors (MT1 and MT2) that belong to the family of seven transmembrane domains coupled to G¹⁷ receptor comprises a quinone reductase enzyme II (MT3) (40; 17) nuclear receptors and protein receptors. Melatonin can promote vascular relaxation enhancing the effects of serotonin on the endothelium (25) by increasing nitric oxide (NO) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in aorta rings and reducing intracellular calcium concentration of vascular smooth muscle (40), among other factors.

Objectives

The objective of this study was to evaluate the effect of melatonin on the contractile response of pulmonary pre-acinar artery, oxidative stress, and lung histology in rats with pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline.

Materials and Methods

1. Animals

The experimental protocol for this study was approved by the Brazilian Committee for Animal Experimentation (COBEA) and by the Ethics Committee on Animal Experimentation - CEEA, State University of Campinas - UNICAMP, protocol no. 1647-1. Male Wistar rats weighing approximately 330 g, placed in collective cages, five animals each, were fed commercial feed and water ad libitum kept in the animal house of the Physiology and Biophysics Department of the Institute of Biology and environment temperature of 20 ± 2 C and dark/light cycle of 12:00 h. The animals were distributed into four experimental groups (n=5): CO (control): MEL (control melatonin): MCT (monocrotaline); MCT+MEL (monocrotaline + melatonin). PAH was induced by a single dose of monocrotaline (60mg/kg, i.p.) on day of experiment (Acro 's Organics - USA) Melatonin (15 mg / kg, i.p.) was administered daily for 28 days experimental period (J. Pineal Res. 2003; 35:75-79 by Sigma-Aldrich Chemicals do Brazil Ltda). The animals were killed by deep anesthesia (ketamine 100 mg / kg plus xylazine 7 mg / kg body weight, i.m.), and removal of the pulmonary artery endothelium for obtaining vascular rings "in vitro" under stimulation with different concentrations of noradrenaline in the presence or absence of melatonin (10⁻⁴M). Lung tissues were excised to calculate tissue wet-to body and wet-to-dry weight ratios, and samples lung were obtained for determination of activity antioxidative enzymes.

2. Vascular Reactivity

2.1. Obtaining vascular rings

The rats were euthanized under anesthesia depth with ketamine and xylazine (100 mg/kg + 7 mg/kg, i.m.), the pulmonary artery is removed and placed in a petri dish containing Kreb's buffer. The artery was cleaned of all fat and adherent tissues, cut into 3 mm rings, the endothelium was kept intact. Each pulmonary artery was divided into two rings: In each experiment, 3 rats provided six rings. Each ring was mounted on two L-shaped hooks placed in the organ bath with 20 ml of Kreb's solution which was maintained at 37 ° C, pH 7.4 and bubbled continuously with a mixture of 95% O₂ and 5 % CO₂. The composition of the Kreb's buffer (pH 7.4) was the following (mM): NaCl 118, KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; KH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; Glucose 11.1; Melatonin 15 mg/kg body weight, was initially dissolved in ethanol (30%) and diluted immediately in Kreb's buffer before use. Arterenol (norepinephrine

bitartrate) was prepared solution of 2% ascorbic acid and stored at -20 ° C for a maximum of seven days.

2.2. Preparation of pulmonary artery rings

Vascular rings were tested for response to different concentrations of norepinephrine (NE) with or without pretreatment with melatonin. Melatonin (10⁻⁴M) was added to the organ bath for 20 min before other vasoactive agents (16, 17). Rings were gradually stretched to reach the voltage half gram (0.5 g) (which represents the resting tension for obtaining optimal response activity) for a period of forty minutes. During the 30 minute stabilization buffer was exchanged every 15 min. After washing, the rings were stimulated at 10 minute intervals with 100 ul of 10⁻⁶M to play NA contraction is completed. The complete procedure of stabilizing and holding the contraction promoted by NA (10⁻⁶M) was performed for each ring before starting the experiment. Before the experiment, a review of all procedures to be used was performed. For each series of experiments, we used a pulmonary artery ring animal groups: CO, MEL, MCT and MCT + MEL.

2.3. Experimental procedure

The effect of pretreatment with melatonin on the contractile response of isolated pulmonary artery rings to norepinephrine was determined. The pulmonary artery rings were incubated for 20 min. with melatonin (10⁻⁴M) and cumulative response to (24, 25) contractile curves to NA were made. The pre-contraction of each ring with NA (1µM) in the stabilization procedure acts as a control to calculate the contraction of rings in response to NA. To record the voltages developed an isometric tension transducer Narco Bio-System (F-60 model), connected to a polygraph four channels Narco Bio-System (model DMP-4, Houston, TX, USA) was used.

2.4. Obtaining concentration-effect curve

The concentration-effect (CCE) curve for each agonist was obtained by the cumulative method, with successive increments of 0.5 log units in the molar concentration of agonist. The maximum response was determined from three successive increasing concentrations of agonist promoted no higher responses than obtained with the preceding concentration. The sensitivity of the rings of aorta and pulmonary arteries was assessed by determining the pD2 value of each agonist. This corresponds to the negative logarithm of the molar concentration

of agonist which causes a response equal to 50% of the maximum response (EC50) in each experiment. In one CCE each ring was obtained for noradrenaline (10⁻¹⁰ - 10⁻⁴M).

3. Measurements of antioxidative enzymes.

Lung tissues were homogenized in a four-volume of ice-cold Tris-Hcl buffer (pH 7.4) using a homogenizer after cutting of the lung into small pieces (for 1 minute at 10 000 rpm). Tissue malondialdehyde (MDA) levels were determined in the homogenates, which were later centrifuged at 5000 g for 60 minutes to remove debris. Clear upper supernatant fl uid was taken and assayed for activities of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and myeloperoxidase (MPO). After the supernatant solution was extracted with an equal volume of ethanol/chloroform mixture (5/3, v/v) and centrifuged at 5000 g for 60 minutes, the upper ethanol phase was taken and used in the superoxide dismutase (SOD) and protein assays. The protein measurement was analyzed in homogenates, supernatant and extracted samples. All antioxidative enzymes indices were determined using a colorimetric assay as described previously (13, 40).

4. Measurement of Lipid Peroxidation.

Lipid peroxides formation was analyzed by measuring the thiobarbituricacid reacting substances (TBARS) in the homogenates (36). The samples were added to a catalytic system of formation of free radicals (FeSO4 0.01mMand ascorbic acid 0.1mM) and then incubated at 37°C for 30 min. The reaction was stopped with 0.5mL of 10% trichloroacetic acid, then the samples were centrifuged (3000 rpm/15 min), and the supernatants were retrieved and mixed with 0.5mL of 0.8% thiobarbituric acid then heated in a boiling water bath for 15 min and after this period, they were immediately kept cold in a bath of ice. Lipid peroxidation was determined by the absorbance at 532nm and was expressed as μmol of malondialdehyde (nMol/mg protein).

5. Histological parameters

Histological sections of the lungs were stained with hematoxylin-eosin and used for qualitative analysis, which was based on identification of the occurrence of changes in lung tissue. Qualitative parameters of the pulmonary circulation were analyzed: alveolar inflammation and edema; cellular injury; vascular changes: vasoconstriction, proliferation of concentric intima, thrombus. Were also determined areas of the alveolar lumen pre-acinar

arteries of the lungs and the area of the experimental groups using the Image-Pro Plus software on optical microscope Leika (magnification 20X).

6. Statistical analysis

Data CCE, Rmax and pD2 values were presented as mean ± standard error of the mean (SEM). A linear regression analysis was used to determine agonist pD2 values . The concentration-effect curves were done using the software Graph-Pad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA), with values for response in the absence of agonist equal to zero. The comparison between the values of the analyzed parameters was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test for comparison between groups. In all cases, p values < 0.05 were accepted as indicative of statistically significant differences.

7. Results and Discussion

MCT-induced pulmonary hypertension relates to the production of reactive oxygen species (ROS), remodeling of pulmonary arteries and hemodynamic deterioration. These factors can induce pulmonary morphological and metabolic alterations impairing the whole organism.

In this study, the table 1 shows a comparison of the morphometric parameters of groups studied. Compared to the control group, MCT group showed loss of body weight and increased lung wet, lung wet/dry, and lung/body weights. Our findings are in agreement with previous reports showing lower final body weight gain in rats treated with MCT (4; 22)

These results can be attributed to increased oxidative stress in rats with pulmonary arterial hypertension (PAH) induced by monocrotaline. Recent reports have implicated increased oxidative stress as a mediator in the pathogenesis and the development of PAH (7)

In this study was evaluated the presence of oxidants and anti-oxidants in experimental pulmonary hypertension. Malondialdehyde (MDA) levels is an index for lipid peroxidation which is representative cellular injury can be used as an indicator of oxidative stress in cells and tissues. Thus, monocrotaline increased MDA content of lung tissue in MCT group when compared with CO group (Table 2).

On the other hand, antioxidant therapy has been effective in the treatment of heart dysfunction in PAH (30). Thus, melatonin, indoleamine produced by the pineal gland, acts in several biological processes due to its antioxidant action and potent scavenger of toxic free radicals (33). Therefore, in this study the treatment with melatonin (MCT+MEL group)

recovered body weight gain (Table 1) and decreased MDA level (Table 2) probably due to its antioxidant effect. Thus, melatonin treatment resulted in the lowered of lipid peroxidation. probably keeping membrane integrity restricting the leakage of activity antioxidants enzymes. An alteration in free radical formation can be accompanied by compensatory changes in the activities of the free radical scavenging enzymes. In this study, enzymatic activity assay showed reduced CAT, SOD, and GSH-Px in lung tissue of MCT rats compared with control. Biphasic changes in antioxidant enzymes have been described in association with the time point of sampling during MCT-induced PAH. These changes include an increase in antioxidant enzymes during hypertrophy stage and a decrease during heart failure stage (12). In this study, CAT, SOD, and GSH-Px activities were higher in MCT+MEL group rats than in MCT induced pulmonary hypertensive rats. A similar observation was previously made (16), showing that CAT, SOD, and GSH-Px activities in the plasma increased obviously in the MCT-induced hypertensive rats with the use of substances that increase the antioxidative capacity of rats. Our results also agree with previous study that provided experimental evidence that melatonin maintained the antioxidant enzyme levels and improved cardiac performance in an animal model of myocardial infarction (26). Thus, ours results might be a scientific support to understand the beneficial effects of melatonin in PAH, in which oxidative stress has long been known to contribute to the pathogenesis.

Pulmonary vascular remodeling is one of the consequences of PAH-induced monocrotaline in rats. PAH comprises multiple molecular pathways that lead to vasoconstriction of the pulmonary arteries and increased pulmonary vascular resistance (39). PAH is often associated with abnormal increased of the smooth muscle cells of the peripheral arteries, intimal hyperplasia, medial hypertrophy of the large muscular pulmonary arteries, and inflammatory infiltrates present in plexiform lesions (27).

Thus, monocrotaline administration can induce pre-acinar artery lesions in the lungs of rats similar to those found in lungs displaying idiopathic PAH (IPAH). Inflammatory cell infiltrates in the range of affected pulmonary arteries, including macrophages and lymphocytes, have been reported in IPAH and PAH associated with other conditions (6).

Increased wall thickness of pulmonary arterioles is a key structural feature of MCT-induced PAH, as evidenced by the remodeling of small pulmonary arteries, vascular cell proliferation and obliteration of the pulmonary microvasculature (35).

In this study, it was observed that decrease alveolar area and leukocyte infiltration in MCT group in relation to CO group (Fig 1B; Fig. 2), and quantitative increase in arteriole media and adventitia thickness in MCT-treated rats compared to control rats (Fig. 3; Fig.4).

However, MCT+MEL group showed a significant increase in alveolar area in relation to MCT (Fig. 1D; Fig. 2) as well as reducing the thickness of the tunica media of pre-acinar arteries of the lung parenchyma (Fig. 3; Fig. 4), suggesting a significant reduction in vascular resistance lungs, contributing to improve the processes of alveolar gas exchange.

Our results agree with previous studies that also observed thickening of alveolar septum and the number of alveoli decreased in rats MCT-treated. In the MCT treated group, the number of infiltrated inflammatory cells was decreased and alveoli were regular in size the control group (20).

These morphologic alterations induced by monocrotaline can impair vascular reactivity of pulmonary arteries. In this study, the adrenergic agonist noradrenaline (NA) caused contraction concentration dependent that reached a maximum at 10⁻⁴ M in pulmonary artery rings of CO group (Fig. 1A). The NA-induced contraction was significantly reduced in pulmonary artery rings from monocrotaline (MCT) treated rats compared with control rats (Fig. 1B), suggesting reduced pulmonary artery reactivity due probably deleterious effects of monocrotaline in vascular endothelium (5). Thus, monocrotaline can influence the function of the arteries by direct effect on smooth muscle cells or by modulating the release of mediators (e.g. adenosine, K+, pH), or by modulation of synthesis of mediators (e.g. prostacyclin, nitric oxide, endothelin). These cellular changes determine the alterations in vascular tone, reactivity and resistance which characterize the chronic pulmonary hypertensive state.

Melatonin pre-treatment (10^{-8;-9} M) for 20 min produced a significant decrease of the contractile response of the intact endothelium pulmonary arterial rings from MEL group rats as compared with the CO group (Fig. 1A). The presence of melatonin decrease the contractile response in 10^{-8;-7} M noradrenaline concentrations (Fig. 1D) in MCT+MEL group rats as compared to MCT group. Therefore, the pre-treatment with melatonin caused significant attenuation of the NA-induced constriction of pulmonary arterial rings in CO and MCT+MEL groups. These results are in accordance with numerous previous studies that showed vasorelaxation in response to melatonin in rat aortic rings (9)

The probable relaxant effect of melatonin can be attributed to increased levels of endothelial nitric oxide, as well as by preventing oxidation by "kidnapping" of free oxygen (31). However, because of monocrotaline induce damage in the vascular endothelium, melatonin may have acted independently of the endothelium, directly on the vascular smooth muscle by decrease intracellular calcium concentration both by reducing the formation of inositol triphosphate (IP₃), as by blocking the voltage-dependent calcium channels. The reduction in concentration of available calcium in the cytoplasm can decrease the interactions

between contractile proteins of smooth muscle, thus reducing the contractile response to noradrenaline in the groups pre-treated with melatonin (MEL and MCT+MEL).

The presence of melatoninergic receptors in the pulmonary trunk rats (11), as demonstrated in the literature (15; 32) reinforces the modulatory role of melatonin on vascular reactivity, as demonstrated in this study.

Conclusion

In conclusion, present study demonstrated monocrotaline administration produced pulmonary lesions in rats. Pulmonary lesions were associated with decreased antioxidant defense status, histopathological changes and increase of oxidative stress markers pulmonary. In addition, the present study provided experimental evidence that melatonin maintained the antioxidant enzyme levels and improved morphometric parameters and lung histology in rats treated with monocrotaline. This finding might be a scientific support to understand the beneficial effects of melatonin on protection against pulmonary injury, in which oxidative stress has long been known to contribute to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.

References

- 1. Anwar MM, Meki AR, Rahma HH. Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol** 2001, 130(3):357–67.
- 2. A national prospective study. **Ann Intern Med** 1987, 107(2):216-223.
- Brown L, Miller J, Dagger A, Sernia C. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats. J Cardiovasc Pharmacol., 1998, 31: 108-115.
- 4. Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. **Lancet** 1995, 345(8962):1408.
- 5. Carlino, C.; Tobias, J.D.; Schneider, R.I. et al., "Pulmonary hemodynamic response to acute combination and monotherapy with sildenafil and brain natriuretic peptide in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension," **American Journal of theMedical Sciences**, 2010, 339 (1): 55–59.
- Christou, H., Reslan, O.M., Mam, V., Tanbe, A.F., Vitali, S.H., Touma, M., Arons, E.S., Mitsialis, A., Kourembanas, S. and Khalil, R.A.. Improved pulmonary vascular reactivity and decreased hypertrophic remodeling during nonhypercapnic acidosis in experimental pulmonary hypertension. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2012, 302: L875–L890.
- 7. Cool C, Kennedy D, Voelkel N, Tuder R: Pathogenesis and evolution of plexiform lesions in pulmonary hypertension associated with scleroderma and human immunodeficiency virus infection. **Hum Pathol** 1997, 28:434-442)
- 8. Cracowski, J.L., Cracowski, C., Bessard, G. et al. Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension, **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2001, 164 (6):1038–1042.

- 9. Dakshinamurti S. Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. **Pediatr Pulmonol** 2005, 39 (6):492–503.
- 10. Das, R., Balonan, L., Ballard, H.J., Ho, S. Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery. International **Journal of Cardiology**, 2008, 126: 340–345.
- 11. Doolen S, Duckles SP, Geary GG, Krause DN. Melatonin mediates vascular dilation via a distinct melatonin receptor sub-type. **Soc Neurosci Abstr** 1997, 23:1517.
- 12. Dubocovich ML. Melatonin receptor: are there multiple subtypes? **Trends Pharmacol Sci** 1995, 16: 50–6.
- 13. Eggers .M., Venge P., Lindhal B., Lind L., Cardiac Troponin I levels measured with a high-sensitive assay increase over time and are strong predictors of mortality in an elderly population. **J. Am. Coll. Cardiol**. 2013. 61(18).
- 14.F. Farahmand, F., Hill, M.F., and Singal, P.K.. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2004, 260 (1), 21–29
- 15. Fu JH, Xue XD. Researches on lipid peroxidation of bronchoalveolar lavage and lung in premature rat with chronic lung disease.
- 16. Goret I., Reboul C, Tanguy S, Dauzat M, Obert P. Training does not affect the alteration in pulmonary artery vasoreactivity in pulmonary hypertensives rats. **Eur J Pharmacol**. 2005, 527: 121-128.
- 17. Herrera EA¹, Macchiavello R, Montt C, Ebensperger G, Díaz M, Ramírez S, Parer JT, Serón-Ferré M, Reyes RV, Llanos AJ. Melatonin improves cerebrovascular function and decreases oxidative stress in chronically hypoxic lambs. **J Pineal Res**. 2014 May 8. doi: 10.1111/jpi.12141.
- 18. Jin, H.F., Du, S.X., Zhao, X. et al. Effects of endogenous sulfur dioxide on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2008, 29 (10): 1157-1166

- 19. Jockers R, Maurice P, Boutin J.A, Delagrange P, Melatonin receptors, heterodimerization signal transduction and binding sites: What's new? **British Journal** of Pharmacology. 2008, 154, 1182-1195.
- 20. Knaapen P, Germans T, Camici PG. et al. Determinants of coronary microvascular dysfunction in symptomatic hypertrophic cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2008 Feb, 294 (2): H986-93.
- 21. Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K, et al. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneosly hypertensive rats. **Clin Expe Hypertens** 1987, 9: 1121-31.
- 22. Lewis M, Flanders S. Mechanism of melatonin-induced vasoconstriction in the rat tail artery: a paradigm of weak vasoconstriction. **Br J Pharmacol** 1999, 126:1408–18.
- 23. Li Pan, Jian-Hua Fu, Xin-Dong Xue, Wei Xu, Ping Zhou, Bing Wei. Melatonin protects against oxidative damage in a neonatal rat model of bronchopulmonary dysplasia. **World J Pediatr** 2009, 5(3):216-221
- 24. McLaughlin VV, Benza RL, Rubin LJ, Channick RN, Voswinckel R, Tapson VF, Robbins IM, Olschewski H, Rubenfire M, Seeger. Addition of inhaled treprostinil to oral therapy for pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled clinical trial. J Am Coll Cardiol 2010, 55: 1915–1922.
- 25. Mohammadi, S., Hossein, M.N., Nasrin, H. et al. Protective Effects ofMethylsulfonylmethane on Hemodynamics and Oxidative Stress inMonocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. **Advances in Pharmacological Sciences** V. 2012, Article ID 507278, 6 pages
- 26. Nomura N, Asano M, Saito T, et al. Cardiotrophin-1 is a prophylactic against the development of chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats. **Ann Thorac Surg** 2003, 76 (1):237–43.

- 27. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Helin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrand P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone redutase 2. **J Biol Chem** 2000, 275: 31311-31317.
- 28. Oriowo M A, Chandrasekhar B, Kadavil E., α 1 adrenoceptor subtypes mediating noradrenaline-induced contraction of pulmonary hypertensives rats. **Eur J Pharmacol**., 2003, 482: 255-263.
- 29. Patel, V., Upaganlawar, A., Zalawadia, R., Balaraman, R. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation. **European Journal of Pharmacology**, 2010, 644:160–168.
- 30. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **J Clin Invest** 2012, 122:4306–4313.
- 31. Redout, E.M., Van Der Toorn, A., Zuidwijk, M.J., et al.. Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertensioninduced heart failure. **American Journal of Physiology**, 2010, 298 (3): H1038–H1047.
- 32. Satake N, Oe H, Shibata S. Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium dependent relaxation. **Gen Pharmacol** 1991, 22:1127–33.
- 33. Shukla P, Lemley C.O, Dubey N, Meyer AM, O'Rourke S.T, Vonnahme, KA. Effect of maternal nutrient restriction and melatonin supplementation from mid to late gestation on vascular reactivity of maternal and fetal placental arteries. **Placenta**. 2014 (14) 159-3.
- 34. Tan, D.X., Chen, L.D., Poeggeler, B. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocr. J.** 1993, (1): 57–60.
- 35. Ting N, Thambyraja A, Sugden D, Scalbert E, Dela P, Wilson VG. Pharmacological studies on the inhibitory action of melatonin and putative melatonin analogues on porcine vascular smooth muscle. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 2000, 361: 327–33.

- 36. Tulloh RM, Hislop AA, Haworth SG. Role of NO in recovery from neonatal hypoxic pulmonary hypertension. Thorax 1999, 54:796–804.
- 37. Uchiyama, M. and Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, **Analytical Biochemistry** 1978, 86 (1): 271–278.
- 38. Viswanathan M, Scalbert E, Delagrange P, Guardiola-Lemaitre B, Saavedra J. Melatonin receptors mediate contraction of a rat cerebral artery. **Neuroreport** 1997, 8:3847–9.
- 39. Wakatsuki A, Okatani Y. Melatonin protects against the free radical induced impairment of nitric oxide production in the human umbilical artery. **J Pineal Res** 2000; 28:172–8.
- 40. Wong CM, Bansal G, Pavlickova L, Marcocci L, Suzuki YJ. Reactive oxygen species and antioxidants in pulmonary hypertension. **Antioxid Redox Signal** 2013, 18:1789–1796
- 41.Wu L, Wang R, de Champlain J. Enhanced inhibition by melatonin of alpha-adrenoceptor-induced aortic contraction and inositol phosphate production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens** 1998, 16: 339–47.

Table 1. Lung morphometric parameters of control, monocrotaline, and melatonin-treated rats.

Parameters	CO	MEL	MCT	MCT+MEL
Initial body wt (g)	341 ± 9	336 ± 6	331 ± 11	326 ± 10
Final body wt (g)	395 ± 8	371 ± 5	300 ± 21 a	347 ± 16 bc
Body weight gain (g)	53 ± 4	40 ± 7	-14 ± 17 a	13 ± 5 bc
Lung wet (g)	1.40 ± 0.05	1.42 ± 0.06	3.15 ± 0.29 a	1.98 ± 0.17 bc
Lung dry (g)	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.56 ± 0.08 a	$0.40\pm0.03 \textbf{bc}$
Lung wet/dry (g)	4.58 ± 0.12	4.49 ± 0.16	5.62 ± 0.5 a	4.90 ± 0.15 c
Lung wet/body (mg/g) 4.16 ± 0.05	4.19 ± 0.08	9.12 ± 0.3 a	6.04 ± 0.28 bc

Data are mean \pm SE. Significant Tukey's post hoc differences compared with controls are indicated by (P < 0.05): (a) CO X MCT; (b) CO X MCT+MEL; (c) MEL X MCT+MEL. CO: control normal; MEL melatonin control; MCT: monocrotaline; MCT+MEL: monocrotaline treated with melatonin. (n=12)

Table 2. Effects of melatonin (MEL) on malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzymes activities of lung tissues in rats with monocrotaline (MCT) induced pulmonary hypertension.

	CO	MEL	MCT	MCT+MEL	
CAT (U/mL)	5.80±0.63	6.33±0.59	3.09±0.83 a	4.73±0.25 c	
SOD (U/mL)	219.27±5.13	223.04±7.37	181.47±4.90 a	205.79±9.18 c	
GSH-px (U/mL)	13.36±0.31	12.21±1.43	6.17±1.28 a	11.62±2.02 c	
MDA (nmol/mg proteir	1.47±0.04 า)	1.42±0.07	3.39±0.20 a	2.01±0.17 bc	

Significant Tukey's (P < 0.05). post hoc differences compared with controls are indicated by **a** (CO X MCT); **b** (CO X MCT+MEL), and **c** (MCT X MCT+MEL) MCT: monocrotaline; SOD: superoxide dismutase; GSH-px: glutathione peroxidase; CAT: catalase; MDA (malondialdehyde). (n=12)

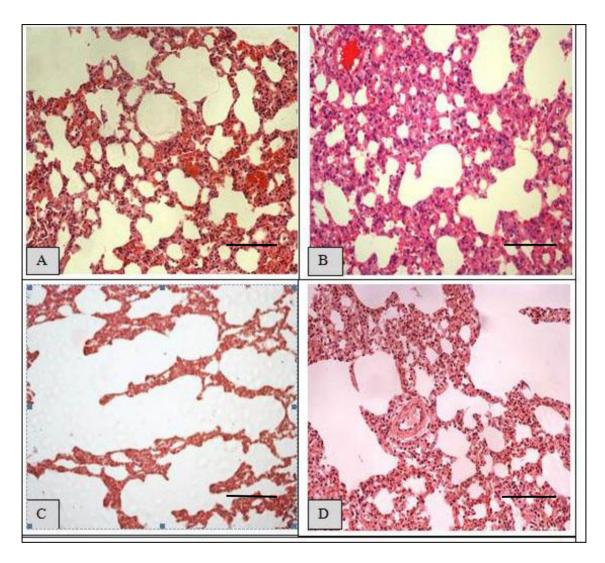


Figure 1. Qualitative morphometric analysis of effect of treatment with MEL on pulmonary alveolar remodeling in MCT model of pulmonary arterial hypertension. Images representatives hematoxylin and eosin-stained lung sections from CO group (A), MCT group (B), MEL group (C) and MCT+MEL group (D). Total magnification X 20. Monocrotaline decreased alveolar área and leukocyte infiltation (B). Melatonin increased alveolar área in MCT+MEL group (D).

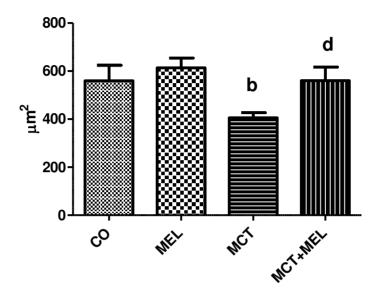


Figure 2. Quantitative morphometric analysis of pulmonary alveolar area. Five rats per experimental group were analyzed by 2 independent investigators. Alveolar area was measured and presented as means \pm SD. (b) Measurements in MCT-treated rats are significantly different (P< 0.05) from corresponding measurements in control rats (CO). (d) Measurements in MCT+MEL group are significantly different (P<0.05) from corresponding measurements in MCT group.

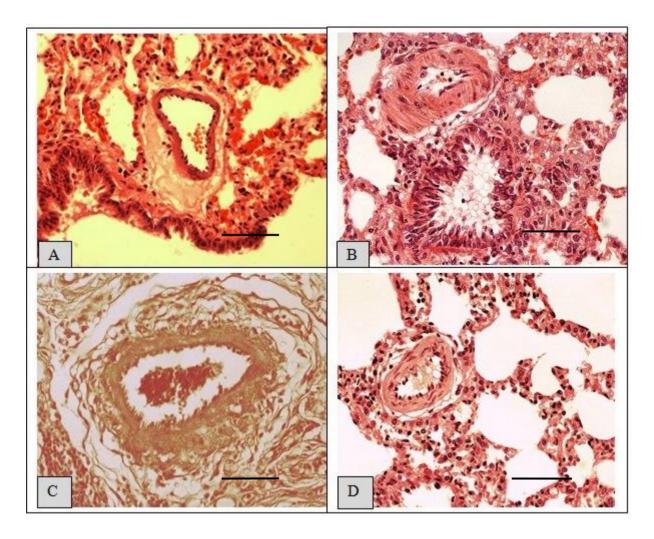


Figure 3. Effect of treatment with MEL on pulmonary arteriolar remodeling in MCT model of pulmonary arterial hypertension. Images representatives hematoxylin and eosin-stained lung sections from CO group (A), MCT group (B), MEL group (C) and MCT+MEL group (D). Total magnification X 20. Monocrotaline decreased pulmonary artery lumen and due to increased medial thickness (B). Melatonin increased diameter of the pulmonary artery lumen in MCT+MEL group (D).

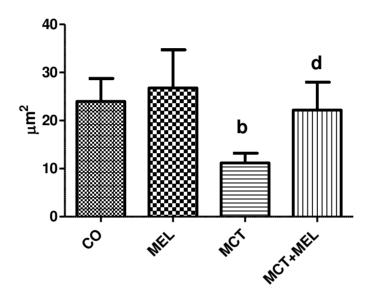


Figure 4. Quantitative morphometric analysis of wall thickness of pulmonary arterioles defined as the area occupied by the vessel wall divided by the total cross-sectional area of the arteriole. Ten pulmonary arterioles (50–100 M diameter) from 5 rats per experimental group were analyzed by 2 independent investigators. Percent wall thickness was measured and presented as means \pm SD. (b) Measurements in MCT-treated rats are significantly different (P< 0.05) from corresponding measurements in MCT+MEL group are significantly different (P<0.05) from corresponding measurements in MCT group.

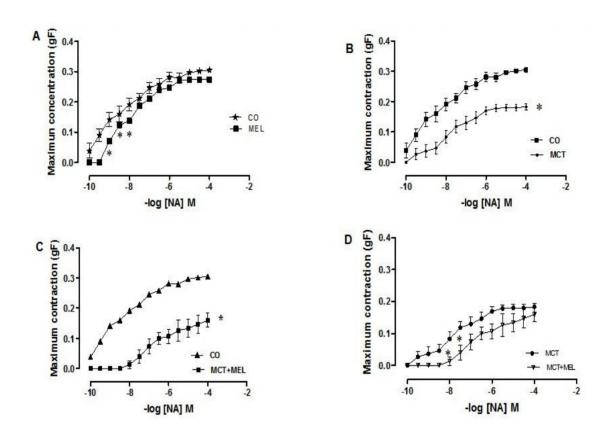


Figure 5. Noradrenaline (NA)-induced contraction in pulmonary artery of control, MCT, MEL and MCT-treated rats with melatonin (MCT+MEL). Pulmonary artery rings were stimulated with increasing concentrations of NA. The contractile response was measured and presented in g/force as % of maximum NA contraction. Data represent means \pm SEM (n 5). (*) Measurements are significantly different (P <0.05) from corresponding measurements in control rats.





Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1999-2, sobre "Efeito cardioprotetor da melatonina em ratos portadores de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrolatina", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas / Luiz Alberto Ferreira Ramos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 08 de fevereiro 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol no <u>1999-2</u>, entitled "<u>Cardioprotective effect of melatonin in rats with pulmonary arterial hypertension induced by <u>manocrotaline</u>", 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 <u>February 8, 2010</u>.</u>

Campinas, 08 de fevereiro 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo

Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/ Conclusion: DPG is an important predictor of incomplete dynamic afterload recovery Post-PEA. Whether this is related to surgically inaccessible chronic thromboembolic disease or to a distal vasculopathy is uncertain.

Disclosure of Interest: None Declared

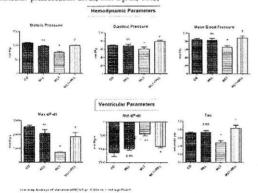
PM104

Melatonin Protects Against Hemodynamic Alterations In Rats With Pulmonary Arterial Hypertension (Pah) Induced By Monocrotaline

Luiz Alberto F. Ramos*, Felix G. R. Reyes1,2, Dora M. Grassi-Kassisse1, Miguel A. Areas ¹Biology Structural and Physiology, ²Food of Toxicology, State University of Campinas -Unicamp, Campinas, Brazil

Introduction: Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is characterized by thickening of vascular smooth muscle cells, affecting the cardio respiratory system. Monocrotaline (MCT) is an alkaloid and an animal model of PAH in rats by cardiovascular alterations. Melatonin (MEL) is a hormone produced by pineal gland, can reduce the smooth muscle vascular tone, and also modulate the hemodynamic parameters.

Objectives: To evaluate the effect of melatonin in the treatment of monocrotaline-induced PAH. Methods: Male Wistar rats (250g.) were divided into four groups: CO (control), MCT (monocrotaline, MEL (melatonin), five animals per group (n=5). MCT was administered as a single dose intraperitoneal (ip) (60mg/Kg ip) to induce PAH. Melatonin was administered (10mg/Kg ip) during 28 days of experimental period, after this phase, the animals were anesthetized (ketamin 100mg/Kg, plus xilazine 7mg/Kg intramuscular) to obtain the hemodynamic parameters and molecular analysis of the heart. Statistical procedure: Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey test for comparison between groups (p<0.05). Results: Reduced mean arterial pressure (Diastolic pressure, Systolic Pressure); Reduction the ventricular pressure(max dP/dt, min Dp/dt, Tau);



Conclusion: Melatonin treatment was able to reduce the changes in peripheral resistance and cardiovascular alterations in rats with PAH.

Paulis L., Simko F., Blood Pressure Modulation and Cardiovascular Protection by Melatonin: Potential Mechanisms Behind. Physiol. Res. 56: 671-684, 2007

Garvan C. Kane, Hilal Maradit-Kremers, Josh P. Slusser, Chris G. Scott. Integration of Clinical and Hemodynamic Parameters in the Prediction of Long-term Survival in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. CHEST / 139 / 6 / JUNE, 2011

Disclosure of Interest: None Declared

PM105

Characteristics of Methicillin Sensitive Staphylococcus Aureus Infective Endocarditis: Eight-Year Retrospective Study

Abdul Rahman Ihdayhid* l , Owen Robinson 2,1 , Imran Sheikh l , Muhammad Shoaib l , Gabrielle Sicari l , Carl Schultz l,j , Xiao-Fang Xu l

Cardiology Department, 2Microbiology and Infectious Diseases Department, PathWest Laboratory Medicine, Royal Perth Hospital, ³ACCESS Typing and Research, School of Biomedical Sciences, Curtin University, ⁴School of Medicine and Pharmacology, University of Western Australia, Perth, Australia

Introduction: Methicillin Sensitive Staphylococcus aureus (MSSA) is a common cause of infective endocarditis (IE).

Objectives: The aim of the study was to understand the risk factors for developing MSSA IE and the subsequent complications and outcomes.

Methods: Blood culture positive MSSA was routinely recorded in a database from 2005-

2012. We retrospectively identified all patients who developed IE. We reviewed demographic, risk factors, echocardiogram findings, complications and outcome.

Results: A total of 53 patients with MSSA IE were included. The median age was 41 years. 91% were community acquired. The main risk factors were Intravenous Drug Use (IVDU) (64%), previous IE (15%), previous staphylococcus infection (13%) and prosthetic valve (11%). Transthoracic echocardiogram (TTE) failed to show vegetations in 19% of IE whose

diagnosis was confirmed on transesophageal echocardiogram (TOE), however all these

patients had suboptimal views or valvular structural abnormalities on TTE.

Tricuspid valve (TV) IE occurred in 51%, Mitral valve (MV) 26%, Aortic valve (AV) 21%, left ventricular outflow tract 2% with no pulmonic valve IE. Aortic root abscess occurred in 6%. Vegetations greater than 1cm were seen in 85% of TV IE compared to 46% of left sided IE (p < 0.01). Perforation of the valve or severe regurgitation occurred in 44% of left sided IE and 44% TV IE. Embolism was associated with 40% of left sided IE compared to 78% of TV IE (p < 0.03). The majority of TV IE embolised to the lung (67%), 28% of left sided IE embolised to the brain, of which 57% had vegetations less than 1 cm (p < 0.03). Surgery was performed in 26% with 39% of left sided IE requiring surgery compared to 15% of TV (P < 0.051). Predictors for surgery were Orients stated its requiring surgery compared to D_2 for $10^4 \times 0.051^2$, its coft vegetation greater than a critic root abscess (100%), severe regurgitation/perforation (57%), size of vegetation greater than 1cm (64%), prosthetic valve IE (67%) and embolism (50%) (P < 0.01). At 1 year 13% died, with

85% within 30 days. I year mortality was 27% for AV IE, 7% for MV and 11% for TV. Conclusion: In our cohort IVDU was the strongest risk factor for developing MSSA IE. In a normal TTE with optimal views and without underlying valvular pathology a TOE may not be indicated. MSSA IE is highly virulent with valvular destruction often requiring surgery and a high rate of systemic embolism irrespective of vegetation size. The majority of TV IE had severe regurgitation, however were medically treated without requiring surgery and had a good outcome at 1 year.

Disclosure of Interest: None Declared

What Is The Morbimortality of The Infective Endocarditis Associated Cardiovascular Implantable Electronic Devices?

Gabriel Perez Baztarrica¹, Flavio Salvaggio¹, Sebastian Villecco¹, Rafael Porcile*¹, Norberto Bornancini¹, Ricardo Levin¹, Ramiro Acevedo², Fernando Bosio², Luis Llanos Mestra¹ ¹Department of Cardiology and Physiology, ²Universitary Hospital, Universidad Abierta Interamericana, Faculty of Medicine, Buenos Aires, Argentina

Introduction: Infective endocarditis (IE) associated to permanent implantable electronic dispositive (PIED) is a complication with variability mortality according different authors. Some questions based on this information when: What is the current mortality? What disparity explains mortality?

Objectives: The objectives were to evaluate in-hospital and long term mortality and morbidity with the current algorithms for management and analyzed some factors that explain the differences with published mortality.

Methods: Patients were studied retrospectively between May/2002 and March/2011 once a diagnosis of IE associated to PIED had been established. Basal characteristics, diagnosis, therapeutical, in-hospital and long term outcomes were analyzed. Continuous variables were expressed as median and interquartile ranges (RIC), and discrete variables were expressed by absolute values and percentages. Statistical data management was performed using the statistics pack Microsoft Excel version 2010.

Results: Included 26 cases treated in our hospital, 23 of whom were referred from other centers for diagnosis and treatment. The average age was 67.5 years. All patients received antibiotics for six weeks and were removed system completely. Transvenous removal was performed in the 95% patients and in 2 patients was required median sternotomy, atriotomy and epicardial pacemaker placement. Median time until removal of an infected device was 44 hs (42.5-51.5. Median time to reimplantation was 43 days (RIC 42-44). In-hospital mortality was 4% and the follow-up was nil The hospital morbidity was 31%. In the follow-up there was no reinfection or other complication.

POPULATR	ON (N:25)	
AGE (years)	Mean, range	67,5(37-92)
SEX	Male.	18(69%)
DATE OF THE STATE OF THE STATE OF	Frevious device replacement	16(82%)
	Diabetes melitus	8(31%)
	Immunosuccression	2(8%)
	Neoplasm	4(15%)
RASAL DISEASE	Onronio renal failure	5(15%)
	Permanent Papemaker (VVI)	8(23%)
	Fermanent Papemaker (DDD)	17(65%)
DISPOSITIVE	Implantable Cardioverter Defibritator	2(12%)
IMPLANTATION LEADS	The median time from IL (months)	12,5 (4-27,75)
	Fever	18(85%)
	Erosian or packet infection	15(58%)
CLINICAL EVIDENCE	Hypotens on (systolic blood pressure < 90 mm Hg)	2(8%)
	Leukocytosis	18(69%)
	High enythropyte sed mentation	21(81%)
LABORATORY ABNORMALITIES	Elevated C-reactive protein	23(85%)
	Fositive blood cultures	24(\$2%)
CULTURES	Positive lead	18(85%)
	Fositive transtricracio	13(50%)
ECHOCAROIOGRAPHY	Fositive Transesconages:	23(88%)

		Population: 26	
Median Hospital Stay (RIC)		42(42-44)	
	Pocket hematoma	3(12%)	
	Pulmonary embolism	3(12%)	
and the same of	Septic Shock	1(4%)	
in-hospital Morbidity	Acuterenal failure	2(8%)	
	Vascular Complications	0(0%)	
	Cardiac Tamponade	0(0%)	

including VARC bleeding, vascular complications, prolonged hospitalization or need for blood transfusion. The mechanism of this complication and impact on long-term outcomes requires further evaluation

Disclosure of Interest: None Declared

Short term clinical outcomes after percutaneous mitral commissurotomy for mitral

Muhammad A. Rauf*', Nida M. Rauf', Wahaj Aman', Mohammad Hafizullah', cardiology departement lady reading hospital peshawar

Cardiology, Lady reading hospital, peshawar, Pakistan

Introduction: Percutaneous Transvenous Mitral Commissurotomy (PTMC) is the treatment of choice for mitral stenosis. Patients with valvular calcification, thickened fibrotic leaflets and subvalvular fusion have adverse short terms outcomes of PTMC.

Objectives: To determine the frequency of short term clinical outcomes of percutaneous transvenous mitral commissurotomy for mitral stenosis among patients having wilkin score

Methods: STUDY DESIGN: Descriptive cross sectional study.

Setting: Cardiology Unit Govt. Lady Reading Hospital Peshawar

Surgices: Surgices and twenty days (July 01, 2012- June 20, 2013). Subjects: One hundred and seventy five patients of mitral stenosis.

Methods: Mitral stenosis patients with or without pre existing mild mitral regurgitation admitted in Cardiology Unit, Lady Reading Hospital Peshawar were included in the study. After performing PTMC according to standard protocol, data regarding improvement in mitral valve area, pulmonary artery pressure and severity of mitral regurgitation was recorded. Results: Out of total 175 patients 56 (32%) were males. The mean age of the patients was 22.69 \pm 7.93 years. Mean BMI of patients was 21.07 \pm 3.95. Mean Wilkin's score was 6.69 \pm 1.99 anging from 3-11. Improvement in mitral valve area, pulmonary artery pressure, mitral valve gradient and left atrial volume were found in 148 (84.6%), 170 (97.1%), 175(100%) and 170(97.1%) respectively. While worsening in mitral regurgitation was 47(26.9%). Conclusion: PTMC is a safe and effective procedure with good short term outcomes like

improvement in mitral valve area, pulmonary arrery pressure, mitral valve gradient and left atrial volume and not worsening mitral regurgitations in patients of mitral stenosis having Wilkin's score ≤ 12

Disclosure of Interest: None Declared

PT110

Melatonin Reduces The Pulmonary Vasoconstriction In Rats With Pulmonary Hypertension Induced By Monocrotaline

Luiz Alberto F. Ramos*, Fernanda P. Henrique-Cabrini, Dora M. Grassi-Kassisse, Miguel A. Areas

Biology Structural and Physiology, STATE UNIVERSITY OF CAMPINAS - UNICAMP, Campinas, Brazil

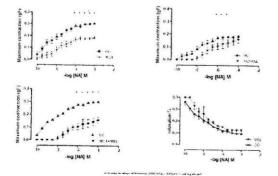
Introduction: Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is characterized by thickening of vascular smooth muscle cells, increased pulmonary arterial pressure and right ventricular hypertrophy and impairs alveolar gas exchange and cardiac function. Monocrotaline (MCT is an alkaloid and an animal model of PAH in rats by cardiovascular alterations. Melatonin (MEL) is a hormone produced by pineal gland, can reduce the smooth muscle vascular tone, and also modulate the hemodynamic parameters.

Objectives: Evaluate the effect of melatonin on the contractile response of pulmonary artery in monocrotaline-induced rats.

Methods: Male Wistar rats (250g.) were divided into four groups: CO (control), MCT (monocrotaline), MEL (melatonin), five animals per group (n=5). MCT was administered (monocrotaline), MEL (melatonin), five animals per group (n=5). MCT was administered as a single dose intraperitoneal (ip) (60mg/Kg ip) to induce PAH. Melatonin was administered (10mg/Kg ip) during 28 days of experimental period, after this phase, the animals were anesthetized (ketamin 100mg/Kg, plus xilazine 7mg/Kg intramuscular) to obtain vascular rings in vitro. Statistical procedure: Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey test for comparison between groups (p<0.05).

Results: Melatonin significantly reduced the contractile response of pulmonary artery and

control rats with PAH for maximum response of vascular reactivity.



Conclusion: - Melatonin treatment was able to reduce the changes in pulme rats with PAH.

References: Anita Umesh et all; - Alteration of Pulmonary Artery Intel Chronic Hypoxia and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension 2011:48:525-537

Disclosure of Interest: None Declared

Dobutamine improves left ventricular diastolic function in pulmonary hypertension

Nithin R. Iyer*1, Edmund M. Lau1,2, Preeti Choudhary1, Christina W. Chan1. David S. Celermajer

¹Department of Cardiology, ²Department of Respiratory and Sleep Medicine, Royc Hospital, Camperdown, Australia

Introduction: In pulmonary arterial hypertension (PAH), left ventricular dysfunction occurs at rest, due to interventricular interaction. Although c clinically used in decompensated right ventricular (RV) failure, the positive effect of dobutamine may worsen LV diastolic abnormalities by shortening d time, thus limiting any rise in cardiac output from improved RV systolic perf effect of dobutamine on LV diastolic function has not previously been char. Objectives: To determine the effect of dobutamine on LV diastolic func

Methods: 11 PAH subjects (age 57±18) and 18 healthy controls (age 49±1 PAH subjects) were studied with Doppler echocardiography at baseline dobutamine infusion (pre-specified infusion end point was 20 mcg/kg/mir bpm). LV diastolic function was assessed by ratio of early transmitral velc Doppler mitral annular early diastolic velocity (E/e'). LV systolic function was systolic medial mitral annular velocity (s') and stroke volume (SV), estimations and the systolic function was systolic medial mitral annular velocity (s') and stroke volume (SV), estimations and the systolic function was assessed by ratio of early transmitral velocity (s') and stroke volume (SV), estimations are systolic function was assessed by ratio of early transmitral velocity (E/e'). systolic incutai initial alimital velocity (5) and stroke volunic (37), estimate ventricular outflow time velocity integral. RV systolic function was assessed annular plane systolic excursion (TAPSE) and systolic tricuspid annular velo Results: At baseline, systolic pulmonary artery pressure was 82±23mmHg in and 21±5mmHg in controls (P<0.001). Baseline E/e' was elevated in compared to controls (12.8±4.9 vs 8.9±3.3cm/s, P=0.02), consistent w stolic filling. Peak dobutamine dose reached was similar between PAH sub kg/min; n=9) and controls (20mcg/kg/min; n=17; P=0.6 vs PAH subjects function improved significantly with dobutamine infusion in both PAH (17.1±0.7cm/s to 11.9±2.9cm/s: P<0.01) and control subjects (7.4: 13.8±2.8cm/s; P<0.001). Dobutamine infusion increased stroke volume in from 57 ± 12 mL to 71 ± 15 mL, accompanied by an increase in RV s' from $10.8\,0\pm7.4$ cm/s (P<0.01) and TAPSE from 1.7 ± 0.4 cm to 1.9 ± 0.4 cm (P=0. amine decreased E/e' in PAH subjects (9.4±3.1; P=0.04 vs baseline) but 1 changed in healthy controls (8.8±2.7; P>0.9 vs baseline).

Conclusion: Dolutamine, a commonly used inotropic agent for the trea failure, improves LV diastolic dysfunction in subjects with PAH. The imp cardiac output seen during dobutamine therapy may, in part, be medic improved LV diastolic filling. Disclosure of Interest: None Declared

Prognostic factors for in-hospital death after valvular heart disease surge

Vitor M. P. Azevedo¹, Wilma F. Golebiovski², Guilherme D. T. Amorim², Amano Regina E. Müller*, Fabio Tagliari2, Marcela Cedenila2, Regina Maria Aquino X Clara Weksler

Research, ²Cardiology, NATIONAL INSTITUTE OF CARDIOLOGY, Rio de Jan

Introduction: In developed counties, valvular heart disease is most related to etiology and prognostic linked to age and comorbidities. It remains doubtfu development countries the prognostic factors are similar, considering that rhe disease (RHD) still brings concern.

Objectives: To study prognostic factors for valvular heart disease surgery in tertiary referral center.

Methods: Retrospective review of 1012 adults patients that were submitted heart disease surgery in Brazil from 2004 and 2012. It was studied in-hospital heart disease surgery in Brazil from 2004 and 2012. It was studied in-hospital any cause. Statistical analyses were accomplished by chi-square, Student t to regression model. Significance was achieved by p<0.05, and all tests were to Results: Mean age 52.2 (15.2) years, BMI 24.7 (4.7), creatinine 1.07 (0.47 clearance 74.3 (29.3), LVEF 60.7% (13.7), LA 4.88cm (1.13), SPAP 51.7m perfusion time 127.0min (52.2), ischemic time 105.5min (43.1), RHD 46 53.6%, Afro-Brazilian 40.1%, diabetes 10.6%, renal failure 2.18%, infective 0.80%, COPD 4.06%, heart failure 60.2% heing NYHA III or IV 63.7% previous control of the contr 9.89%, COPD 4.96%, heart failure 60.2% being NYHA III or IV 63.7%, previ surgery 18.0%, moderate/severe valvular lesions: aortic stenosis 32.8%, mi 36.2%, aortic regurgitation 29.8%, mitral regurgitation 45.3%, tricuspid 1 21.7%, CABG associated 15.6%. Mortality rate was 17.0% (172). In univariate 21.7%, CABG associated 15.6%. Mortality rate was 17.0% (172). In univariate death, they were factors: age (deceased 59.8±13.9 vs survivor 50.7±15.8 creatinine 1.24±0.8 vs 1.03±0.34 (p<0.001), creatinine clearance (77.1±29.5 (p<0.001), IVEF 57.9±15.0 vs 61.2±13.3 (p=0.004), perfusion t 75.4 vs 118.5±41.1 (p<0.001), ischemic time 134.2±58.9 vs 99.6±36.3 (p<0.010), diabetes 25.7% vs 16.0% (p=0.010), diabetes 25.7% vs 16.0% (p=0.011), diabetes 25.7% vs 16.5% (p<0.001), previous valvular surgery 27.0% vs 14.8% moderate/severe tricuspid regurgitation 21.8% vs 15.7% (p=0.033), CABC