

**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

**EFEITOS BENÉFICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE GRELINA NUM  
MODELO PEDIÁTRICO DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA  
PELA MONOCROTALINA**

**ANA LUÍSA VIEIRA DE CASTRO RAMOS DAS NEVES**

**PORTO, 2007**

**DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE MESTRE  
APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DO PORTO**

**MESTRADO EM MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR**

**SERVIÇO DE FISIOLOGIA**

**ORIENTADOR**

**PROFESSOR DOUTOR ADELINO LEITE MOREIRA**

**CO-ORIENTADOR**

**PROFESSOR DOUTOR JOSÉ CARLOS AREIAS**

# **AGRADECIMENTOS**

**À MINHA FAMÍLIA, PELO QUE SOU E PELO SEU APOIO INCONDICIONAL.**

**AOS MEUS AMIGOS, PELO SEU APOIO INEQUÍVOCO.**

**AOS MEUS PROFESSORES, PELOS CONHECIMENTOS E EXEMPLO QUE ME TRANSMITIRAM.**

**AO PROFESSOR DOUTOR JOSÉ CARLOS AREIAS, PELO EMPENHO NA MINHA FORMAÇÃO,  
PELO INCENTIVO E ENTUSIASMO PELAS CIÊNCIAS BÁSICAS E PELA CARDIOLOGIA  
PEDIÁTRICA, PELO SEU EXEMPLO.**

**AO PROFESSOR DOUTOR ADELINO LEITE MOREIRA, PELA DISPONIBILIDADE COM QUE ME  
RECEBEU NO SERVIÇO DE FISIOLOGIA, PERMITINDO-ME INTEGRAR A EQUIPA DE  
INVESTIGAÇÃO E DOCÊNCIA E PELO EMPENHO TÉCNICO-CIENTÍFICO QUE DEMONSTROU  
ENQUANTO ORIENTADOR DO MESTRADO.**

**AO DR. TIAGO HENRIQUES COELHO, AO DR. MÁRIO SANTOS, À DR.<sup>a</sup> SÍLVIA OLIVEIRA E AO  
DR. DANIEL GONÇALVES, POR TEREM TORNADO ESTE TRABALHO POSSÍVEL.**

**À DR.<sup>a</sup> MARIA JOÃO BAPTISTA, POR ACREDITAR E APOIAR AS MINHAS ACTIVIDADES CLÍNICA  
E DE INVESTIGAÇÃO, BEM COMO PELO EMPENHO NA MINHA FORMAÇÃO.**

**À DR.<sup>a</sup> TERESA VAZ, AO DR. JOSÉ MONTERROSO, AO DR. EDUARDO DIAS DA SILVA, AO  
DR. ANTÓNIO VIEIRA, AO DR. JORGE MOREIRA, À DR.<sup>a</sup> CLÁUDIA MOURA, À DR.<sup>a</sup> ANA LUÍSA  
CARRIÇO E À DR.<sup>a</sup> PATRÍCIA COSTA, PELA FORMA COMO ME RECEBERAM NO SERVIÇO DE  
CARDIOLOGIA PEDIÁTRICA.**

**A TODOS OS QUE CONTRIBUEM DIRECTA OU INDIRECTAMENTE PARA O DESENVOLVIMENTO  
DA CIÊNCIA E SUA APLICAÇÃO NO CUIDADO ÀS CRIANÇAS DOENTES.**

## **CORPO DOCENTE DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO**

**DOUTOR ABEL JOSÉ SAMPAIO DA COSTA TAVARES**

**DOUTOR ALEXANDRE ALBERTO GUERRA SOUSA PINTO**

**DOUTOR AMÂNDIO GOMES SAMPAIO TAVARES**

**DOUTOR ANTONIO AUGUSTO LOPES VAZ**

**DOUTOR ANTÓNIO CARVALHO ALMEIDA COIMBRA**

**DOUTOR ANTÓNIO FERNANDES DA FONSECA**

**DOUTOR ANTÓNIO FERNANDES OLIVEIRA BARBOSA RIBEIRO BRAGA**

**DOUTOR ANTÓNIO GERMANO PINA SILVA LEAL**

**DOUTOR ANTÓNIO LUÍS TOMÉ DA ROCHA RIBEIRO**

**DOUTOR ANTÓNIO MANUEL SAMPAIO DE ARAÚJO TEIXEIRA**

**DOUTOR ARTUR MANUEL GIESTEIRA DE ALMEIDA**

**DOUTOR CÂNDIDO ALVES HIPÓLITO REIS**

**DOUTOR CARLOS RODRIGO MAGALHÃES RAMALHÃO**

**DOUTOR DANIEL SANTOS PINTO SERRÃO**

**DOUTOR EDUARDO JORGE CUNHA RODRIGUES PEREIRA**

**DOUTOR FERNANDO DE CARVALHO CERQUEIRA MAGRO FERREIRA**

**DOUTOR FERNANDO TAVARELA VELOSO**

**DOUTOR FRANCISCO JOSÉ ZARCO CARNEIRO CHAVES**

**DOUTOR FRANCISCO DE SOUSA LÉ**

**DOUTOR HENRIQUE JOSÉ FERREIRA GONÇALVES LECOUR DE MENEZES**

**DOUTOR JOÃO SILVA CARVALHO**

**DOUTOR JOAQUIM GERMANO PINTO MACHADO CORREIA DA SILVA**

**DOUTOR JOAQUIM OLIVEIRA COSTA MAIA**

**DOUTOR JOSÉ AUGUSTO FLEMING TORRINHA**

**DOUTOR JOSÉ CARVALHO DE OLIVEIRA**

**DOUTOR JOSÉ FERNANDO BARROS CASTRO CORREIA**

**DOUTOR JOSÉ MANUEL COSTA MESQUITA GUIMARÃES**

**DOUTOR LEVI EUGÉNIO RIBEIRO GUERRA**

**DOUTOR LUÍS ALBERTO MARTINS GOMES DE ALMEIDA**

**DOUTOR MANUEL AUGUSTO CARDOSO DE OLIVEIRA**

**DOUTOR MANUEL MACHADO RODRIGUES GOMES**

**DOUTOR MANUEL TEIXEIRA AMARANTE JÚNIOR**

**DOUTORA MARIA DA CONCEIÇÃO FERNANDES MARQUES MAGALHÃES**

**DOUTOR MÁRIO JOSÉ CERQUEIRA GOMES BRAGA**

**DOUTOR SERAFIM CORREIA PINTO GUIMARÃES**

**DOUTOR VALDEMAR MIGUEL BOTELHO DOS SANTOS CARDOSO**

**DOUTOR WALTER FRIEDRICH ALFRED OSSWALD**

**DOUTOR MANUEL MARIA PAULA BARBOSA**

**DOUTOR MANUEL ALBERTO COIMBRA SOBRINHO SIMOES**

**DOUTOR JORGE MANUEL MERGULHAO CASTRO TAVARES**

**DOUTORA MARIA ISABEL AMORIM DE AZEVEDO**

**DOUTORA MARIA AMELIA DUARTE FERREIRA**

**DOUTOR JOSÉ AGOSTINHO MARQUES LOPES**

**DOUTOR PATRÍCIO MANUEL VIEIRA ARAÚJO SOARES SILVA**

**DOUTOR DANIEL FILIPE LIMA MOURA**

**DOUTOR BELMIRO DOS SANTOS PATRICIO**

**DOUTOR ALBERTO MANUEL BARROS DA SILVA**

**DOUTOR JOSE MANUEL LOPES TEIXEIRA AMARANTE**

**DOUTOR JOSE HENRIQUE DIAS PINTO DE BARROS**

**DOUTORA MARIA FÁTIMA MACHADO HENRIQUES CARNEIRO**

**DOUTORA ISABEL MARIA AMORIM PEREIRA RAMOS**

**DOUTORA DEOLINDA MARIA VALENTE ALVES LIMA TEIXEIRA**

**DOUTORA MARIA DULCE CORDEIRO MADEIRA**

**DOUTOR CASSIANO PENA DE ABREU E LIMA**

**DOUTOR ALTAMIRO MANUEL RODRIGUES COSTA PEREIRA**

**DOUTOR RUI MANUEL ALMEIDA MOTA CARDOSO**

**DOUTOR ANTONIO CARLOS FREITAS RIBEIRO SARAIVA**

**DOUTOR ÁLVARO JERONIMO LEAL MACHADO DE AGUIAR**

**DOUTOR ANTÓNIO JOSÉ PACHECO PALHA**

**DOUTOR JOSE LUÍS MEDINA VIEIRA**

**DOUTOR JOSE CARLOS NEVES DA CUNHA AREIAS**

**DOUTOR MANUEL JESUS FALCAO PESTANA VASCONCELOS**

**DOUTOR JOÃO FRANCISCO MONTENEGRO ANDRADE LIMA BERNARDES**

**DOUTORA MARIA LEONOR MARTINS SOARES DAVID**

**DOUTOR FERNANDO MANUEL MENDES FALCÃO DOS REIS**

**DOUTOR RUI MANUEL LOPES NUNES**

**DOUTOR AMADEU PINTO DE ARAUJO PIMENTA**

**ARTIGO 48, PARÁGRAFO 3**

**“A FACULDADE NÃO RESPONDE PELAS DOUTRINAS EXPENDIDAS NA DISSERTAÇÃO.”**

**(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931, Decreto nº 19337)**

## RESUMO

**INTRODUÇÃO.** A hipertensão pulmonar (HTP) é caracterizada por alterações estruturais dos vasos pulmonares, bem como por hipertrofia ventricular direita. A reversibilidade da remodelagem vascular pulmonar só é possível em fases da vida muito precoces. A caracterização de um modelo de HTP pediátrica poderá possibilitar o estudo da fisiopatologia da doença e de novas abordagens terapêuticas. A grelina (Ghr) é um peptídeo vasoactivo com vários efeitos cardiovasculares.

**OBJECTIVOS.** Os objectivos deste estudo foram estabelecer um modelo de HTP pediátrica induzida pela monocrotalina (MCT) e avaliar os efeitos morfométricos e hemodinâmicos da administração de Ghr.

**MÉTODOS.** Para estabelecer um modelo de HTP pediátrica induzida pela MCT, foram efectuados ensaios com diferentes doses de MCT (60mg/Kg; 50 mg/Kg e 30mg/Kg) e avaliada a sobrevida aos 21 dias após a administração de MCT. Para avaliar os efeitos morfométricos e hemodinâmicos da administração de Ghr, ratos *Wistar* com 8 dias de vida receberam, aleatoriamente, MCT (30 mg/Kg, subcutânea) ou igual volume de soro fisiológico. Em D7 após injeção (15 dias de vida), os animais que receberam MCT, foram tratados com Ghr (100 mg/Kg, subcutânea, *bid*) ou veículo (soro fisiológico, SF) durante 2 semanas. Em D21 (29 dias de vida), os animais foram instrumentados e procedeu-se ao registo de parâmetros hemodinâmicos biventriculares. O coração e os pulmões foram dissecados e pesados.

**RESULTADOS.** Foi estabelecido um modelo de HTP em idade pediátrica, utilizando uma dose de MCT de 30mg/Kg, metade da dose estabelecida para o modelo adulto. Os animais do grupo MCT apresentavam um peso inferior aos do grupo controlo. No entanto, os animais tratados com Ghr apresentaram peso significativamente superior

aos animais do grupo controlo. Os pesos do coração e dos pulmões aumentaram também significativamente no grupo MCT, em comparação com o grupo controlo. A administração de Ghr atenuou os efeitos da MCT sobre os pesos cardíaco e pulmonar. A pressão sistólica máxima no ventrículo direito ( $PVD_{max}$ ), aumentou significativamente no grupo MCT. O tratamento com Ghr reduziu significativamente o grau de HTP. No grupo MCT verificou-se um aumento significativo da velocidade máxima de elevação da pressão ( $dP/dt_{max}VD$ ), que foi significativamente reduzida no grupo tratado com Ghr. No grupo MCT ocorreu disfunção diastólica, traduzida pelo aumento do  $\tau$  (tau, constante de tempo inversamente proporcional à velocidade de relaxamento miocárdico) e da pressão telediastólica no VD. No grupo tratado com Ghr ocorreu diminuição significativa da velocidade de relaxamento e da pressão telediastólica. Em relação aos parâmetros hemodinâmicos do ventrículo esquerdo (VE), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

**DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.** Foram caracterizados, pela primeira vez, os parâmetros hemodinâmicos de ratos *Wistar* em idade pediátrica e foi estabelecido um modelo de HTP induzida pela MCT. Animais injectados com MCT apresentaram hipertrofia ventricular direita e esquerda, hipertensão pulmonar (elevação da pressão sistólica máxima no VD) e disfunção diastólica ventricular direita (elevação da pressão telediastólica e velocidade de relaxamento miocárdico mais lenta no VD). A administração de Ghr reverteu parcialmente a hipertrofia ventricular e melhorou os parâmetros hemodinâmicos do VD. Estes efeitos benéficos da Ghr abrem uma janela de oportunidade terapêutica da hipertensão pulmonar pediátrica.

# ÍNDICE

	PÁGINA
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>DEFINIÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>HIPERTENSÃO PULMONAR PERSISTENTE DO RECÉM-NASCIDO</b>	<b>3</b>
<b>HIPERTENSÃO PULMONAR RELACIONADA COM A HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA</b>	<b>5</b>
<b>CONGÉNITA</b>	
<b>HIPERTENSÃO PULMONAR RELACIONADA COM AS CARDIOPATIAS CONGÉNITAS</b>	<b>6</b>
<b>FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO PULMONAR</b>	<b>8</b>
<i>Vasoconstrição</i>	<b>8</b>
<i>Proliferação celular</i>	<b>10</b>
<i>Alterações da coagulação</i>	<b>11</b>
<i>Angiogénese e apoptose</i>	<b>12</b>
<i>Mutações do “bone morphogenic protein receptor type 2”</i>	<b>16</b>
<b>MODELO DA MONOCROTALINA</b>	<b>18</b>
<b>DIAGNÓSTICO DE HIPERTENSÃO PULMONAR</b>	<b>21</b>
<b>OPÇÕES TERAPÊUTICAS ACTUAIS</b>	<b>22</b>
<b>PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS FUTURAS</b>	<b>25</b>
<b>PROGNÓSTICO</b>	<b>31</b>
<b>OBJECTIVOS</b>	<b>32</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>59</b>

# INTRODUÇÃO

## HIPERTENSÃO PULMONAR PEDIÁTRICA

### DEFINIÇÃO

A definição de Hipertensão pulmonar (HTP) é baseada na demonstração de uma pressão média na artéria pulmonar  $\geq 25$  mmHg em repouso ou  $\geq 30$  mmHg durante o exercício, com pressão de encravamento da artéria pulmonar normal ( $\leq 15$  mmHg) e resistência vascular pulmonar aumentada (Rosenzweig e *Col.* 2004). A definição de HTP nas crianças é igual à do adulto (Widlitz e Barst 2003). A inclusão de alterações hemodinâmicas com o exercício, na definição de HTP, é de particular importância na criança uma vez que crianças com HTP têm, frequentemente, uma resposta exagerada do leito vascular ao exercício. As crianças têm também maior reactividade vascular à hipoventilação (Rosenzweig e *Col.* 2004). A HTP inclui um grupo de doenças caracterizadas pelo aumento progressivo da resistência vascular pulmonar (RVP), conduzindo a insuficiência cardíaca direita e morte (Simonneau e *Col.* 2004).

Em 2003, no 3º Simpósio Mundial, foi proposta uma nova classificação diagnóstica que categorizou a doença vascular pulmonar por entidades clínicas frequentes, reflectindo avanços recentes na compreensão das doenças pulmonares hipertensivas e reconhecendo a semelhança entre HTP idiopática (de causa desconhecida, diagnóstico de exclusão) e HTP de outras causas. Foram classificadas como HTP arterial, a HTP relacionada com as cardiopatias congénitas, doenças do tecido conjuntivo, hipertensão portal, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), fármacos, hipertensão pulmonar persistente do

recém-nascido e HTP idiopática. Esta classificação separa a HTP arterial da HTP venosa, HTP associada a alterações do sistema respiratório e/ou hipoxemia, HTP devida a fenómenos tromboembólicos e HTP devida a fenómenos que afectam directamente os vasos pulmonares (Tabela 1).

**Tabela 1 – Classificação clínica da hipertensão pulmonar  
(3º Simpósio Mundial, Veneza 2003)**

---

1.	Hipertensão arterial pulmonar
1.1.	Idiopática
1.2.	Familiar
1.3.	Associada com:
1.3.1.	Doenças do tecido conjuntivo
1.3.2.	Cardiopatía congénita ( <i>shunt</i> sistémico-pulmonar)
1.3.3.	Hipertensão portal
1.3.4.	Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana
1.3.5.	Fármacos e toxinas
1.3.6.	Outras (doenças da tiróide, deposição do glicogénio, doença de Gaucher, telangiectasia hemorrágica hereditária, hemoglobinopatias, doenças mieloproliferativas, esplenectomia)
1.4.	Associada com envolvimento venoso ou capilar significativo
1.4.1.	Doença pulmonar veno-oclusiva
1.4.2.	Hemangiomasose capilar pulmonar
1.5.	Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido

---

2.	Hipertensão pulmonar associada com doenças do coração esquerdo
2.1.	Doença da aurícula ou ventrículo esquerdo
2.2.	Doença das válvulas esquerdas

---

3.	Hipertensão pulmonar associada com doenças respiratórias e/ou hipoxia
3.1.	Hérnia diafragmática congénita
3.2.	Doença das membranas hialinas
3.3.	Displasia broncopulmonar
3.4.	Displasia capilar alveolar
3.5.	Fibrose cística
3.6.	Doença pulmonar obstrutiva crónica
3.7.	Doença intersticial pulmonar
3.8.	Perturbações respiratórias relacionadas com o sono
3.9.	Perturbações da hipoventilação alveolar
3.10.	Exposição crónica a altitude

---

4.	Hipertensão pulmonar devido a fenómenos trombóticos crónicos ou doença embólica
4.1.	Obstrução tromboembólica das artérias pulmonares proximais
4.2.	Obstrução tromboembólica das artérias pulmonares distais
4.3.	Embolismo pulmonar não trombótico (tumor, parasitas, corpo estranho)

---

5.	Outras
5.1.	Sarcoidose
5.2.	Histiocitose X
5.3.	Linfangiomasose
5.4.	Compressão dos vasos pulmonares (adenopatía, tumor, mediastinite fibrosante).

---

A prevalência da HTP nas crianças é desconhecida. Estima-se que a incidência da HTP idiopática é 1-2 novos casos/milhão de habitantes. No entanto, têm sido publicados frequentemente, casos confirmados, o que sugere que a incidência seja superior. Tem sido diagnosticada HTP idiopática na autópsia de lactentes com o diagnóstico presumido de morte súbita (Rosenzweig e Col. 2004).

A incidência por género feminino:masculino é de 1,8:1, sem diferença significativa entre recém-nascidos e crianças maiores (Rosenzweig e Col. 2004).

Segundo os dados do *Primary Pulmonary Hypertension National Institutes of Health Registry*, a sobrevida média global foi de 2,8 anos, enquanto que a das crianças foi de apenas 10 meses (D'Alonzo e Col. 1991).

A extrapolação do adulto para a criança não é directa porque as crianças têm à partida uma esperança média de vida maior e uma maior reactividade da circulação pulmonar que faz prever melhor resultado das terapêuticas vasodilatadoras (Widlitz e Barst. 2003).

#### **HIPERTENSÃO PULMONAR PERSISTENTE DO RECÉM-NASCIDO**

Recentemente têm aumentado os conhecimentos relativos à fisiologia da circulação fetal bem como sobre a transição para a vida extra-uterina. O volume sanguíneo no feto humano corresponde aproximadamente a 10-12% do peso corporal, comparado com 7-8% no adulto. O fluxo pulmonar no feto humano é estimado em 13-25%, embora um estudo refira que a quantidade de sangue distribuída aos pulmões é de apenas 11%, o que está mais de acordo com os estudos prévios em animais. Uma transição na hemodinâmica fetal parece ocorrer às 28-32 semanas quando o fluxo pulmonar atinge o máximo com uma alteração simultânea na sensibilidade ao oxigénio nos vasos pulmonares (Kiserud 2005;

Kiserud e Acharya. 2004). Após o nascimento, a circulação pulmonar deve acomodar o débito cardíaco total; estímulos para que isto aconteça incluem a oxigenação aumentada, o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e a bradicinina (Mathew e Altura. 1990). A remodelagem da parede vascular também ocorre ao nascimento (Basu e Col. 1996). Na análise morfométrica (estudos *post mortem*), as artérias fetais humanas são descritas como células musculares lisas alinhadas, numa camada média comprimida com um lúmen arterial estreito; durante a transição, estas células tornam-se alongadas e fusiformes. Progressivamente durante 1 mês, ocorre remodelagem com crescimento, aumento da espessura da parede, deposição de tecido conjuntivo e maturação do músculo liso vascular (Allen e Haworth. 1988).

A hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido define-se como uma insuficiência do relaxamento vascular pulmonar normal ao nascimento ou no período pós-natal imediato (Lakshminrusimha e Steinhorn. 1999) e caracteriza-se por resistência vascular pulmonar aumentada, *shunt* direito-esquerdo (a nível auricular ou do canal arterial) e hipoxemia grave. Está frequentemente associada a alterações do parênquima pulmonar (aspiração de mecônio, pneumonia ou sépsis) e ocorre quando há hipoplasia pulmonar, maladaptação da vasculatura pulmonar *in utero* ou como consequência do stresse perinatal (Rosenzweig e Col. 2004). Um a 2 recém-nascidos de termo/1000 nados vivos têm hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido. Na maioria dos casos é transitória, com recuperação completa, sem necessidade de terapêutica médica a longo prazo (Rosenzweig e Col. 2004).

O curso da hipertensão pulmonar é bifásico, com uma fase inicial de hipertensão pulmonar por vasoconstrição e uma fase tardia, caracterizada por fibrose, que resulta num aumento fixo das resistências vasculares pulmonares e é

irreversível. (Dakshinamurti 2005). A nível histológico, a hipertensão pulmonar terminal caracteriza-se por espessamento da camada vascular média, hiperplasia e hipertrofia da camada de músculo liso, bem como aumento da deposição de matriz extra-celular (McLeod e Col. 1999). A taxa de mortalidade é de 10% (Lorch e Col. 2004).

#### **HIPERTENSÃO PULMONAR RELACIONADA COM A HÉRNIA DIAFRAGMÁTICA CONGÉNITA**

A hérnia diafragmática congénita (HDC) tem uma incidência de 1/2500 nados vivos e está associada a morbilidade e mortalidade significativas (Colvin 2005). Baptista e colaboradores demonstraram que no rato com hérnia diafragmática congénita, não há evidência de imaturidade miocárdica, propondo que a insuficiência cardíaca aguda frequentemente observada em neonatos com hérnia diafragmática congénita, poderia ser atribuída principalmente à sobrecarga cardíaca secundária à HTP (Baptista e Col. 2006).

A HTP clinicamente significativa é frequente em recém-nascidos com hérnia diafragmática congénita, resultando em *shunt* direito-esquerdo a nível pré e pós-ductal, hipoxemia e insuficiência cardíaca direita nos casos mais graves. Mesmo naqueles sem manifestações clínicas de *shunt*, têm, quase universalmente, sinais ecocardiográficos de resistências vasculares pulmonares e pressões no VD aumentadas. O pulmão é pequeno e estruturalmente anormal; a árvore vascular não só tem tamanho reduzido como responde anormalmente aos vasodilatadores. Durante os últimos 20 anos a ventilação mecânica, a contemporização da cirurgia e a melhoria nos cuidados peri-operatórios, tiveram grande impacto na diminuição da mortalidade nesta patologia. O uso de prostaglandina E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) deve ser

considerado precocemente se houver HTP hemodinamicamente significativa, disfunção ventricular direita e canal arterial patente restritivo. Em determinados indivíduos, o óxido nítrico inalado (NOi) pode ser útil, mas a resposta deve ser confirmada por ecocardiografia. Em doentes que sobrevivem à cirurgia e têm alta hospitalar, as causas de morbidade crónica devem ser controladas por uma equipa multidisciplinar (Mohseni-Bod e Bohn. 2007).

### **HIPERTENSÃO PULMONAR RELACIONADA COM AS CARDIOPATIAS CONGÉNITAS**

Em crianças com cardiopatia congénita, a HTP complica o curso da cardiopatia e representa um dos maiores determinantes de morbidade e mortalidade (Beghetti e Col. 2006). Foi descrito que aproximadamente 5% a 10% dos doentes com cardiopatia congénita desenvolvem HTP (Diller e Gatzoulis. 2007). O síndrome de *Eisenmenger* inclui todos os *shunts* sistémico-pulmonares que conduzem a hipertensão pulmonar resultando num *shunt* reverso ou bidireccional (Rabinovitch 1999). O síndrome de *Eisenmenger* pode ser causado por comunicações interventriculares (CIV), interauriculares (CIA) e canal arterial patente (PCA).

A CIV é a cardiopatia congénita mais comum (20-30% dos doentes com cardiopatia congénita). O desenvolvimento de HTP com doença vascular pulmonar parece estar relacionado com o tamanho da comunicação (Galiè e Col. 2004), a magnitude do *shunt* e com as resistências vasculares pulmonares (Eysmann e Col. 1989). CIVs pequenas habitualmente não causam sintomas durante a infância e encerram espontaneamente; CIV moderadas-grandes encerram espontaneamente com menor frequência e podem resultar em HTP (Raymond e Col. 2002). Calcula-se que 10% dos doentes com CIV de qualquer tamanho e com mais de 2 anos podem desenvolver síndrome de *Eisenmenger* e que isto ocorre em 4-6% dos doentes com

CIA. Dos doentes com CIVs grandes (>1,5 cm de diâmetro), 50% vão desenvolver HTP, em contraste com apenas 3% daqueles com CIV pequenas. Habitualmente a correcção cirúrgica precoce evita o desenvolvimento subsequente de HTP (Galiè e Col. 2004).

Na HTP, os vasos pulmonares perdem a capacidade de se dilatarem e de serem recrutados em resposta a um aumento do fluxo sanguíneo, o que origina aumento da pressão na artéria pulmonar. O ventrículo direito (VD) hipertrofia em resposta a este aumento da pós-carga. A adaptação do VD permite que o sangue seja bombeado contra uma pressão aumentada, mas isto ocorre com prejuízo da integridade do ventrículo esquerdo (VE), com disfunção diastólica do VE e subsequente agravamento da insuficiência cardíaca direita (Boxt e Col. 1992; Lourenço e Col. 2006).

Por definição, a HTP hipercinética refere-se a comunicações sistémico-pulmonares com aumento do fluxo sanguíneo pulmonar, por exemplo CIV e PCA. A hipertensão pulmonar venosa é causada por alterações do enchimento do coração esquerdo como, por exemplo na drenagem anómala total das veias pulmonares, na estenose mitral ou na insuficiência do ventrículo esquerdo.

A doença vascular pulmonar relacionada com as cardiopatias congénitas (Síndrome de *Eisenmenger*) desenvolve-se por exposição a *shear stress* hipercinético após um período de resistência vascular pulmonar normal e fluxo sanguíneo aumentado (Rosenzweig e Col. 2004). Aproximadamente 1/3 dos doentes com cardiopatia congénita não corrigida vão morrer por doença vascular pulmonar.

## FISIOPATOLOGIA DA HIPERTENSÃO PULMONAR

### **Vasoconstrição**

A vasoconstrição pulmonar é um componente precoce na HTP (Humbert e *Col.* 2004). A disfunção endotelial pode resultar no desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores (diminuição da razão metabólitos da prostaciclina/tromboxano  $A_2$ , associado a uma diminuição da produção de óxido nítrico e aumento da serotonina) e inibição dos canais de potássio dependentes da voltagem das células musculares lisas das artérias pulmonares (Yuan e *Col.* 1998; Puri 2007).

A prostaciclina ( $PGI_2$ ) é um vasodilatador endógeno importante, que actua através da activação de vias dependentes do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). A  $PGI_2$  também inibe a proliferação vascular de células musculares lisas e diminui a agregação plaquetária. A síntese de  $PGI_2$ , pelas células endoteliais de doentes com HTP, está diminuída. A análise de metabólitos da  $PGI_2$  na urina, mostrou uma diminuição da quantidade de 6-cetoprostaglandina  $F1\alpha$ , um metabólito estável da  $PGI_2$  (Christman e *Col.* 1992). Adicionalmente, nas células endoteliais deste doentes há uma diminuição da expressão da síntase da prostaciclina (Tuder e *Col.* 1999).

Foi demonstrada a diminuição da expressão da síntase do NO nas células endoteliais de doentes com HTP (Giad e Saleh. 1995).

A expressão da endotelina-1 (ET-1, potente vasoconstritor e mitogénico), também está aumentada em doentes com HTP, sugerindo que esta tem um papel patogénico (Puri e *Col.* 2007). Através da sua acção no receptor tipo A da endotelina (ET-A) das células musculares lisas pulmonares, a ET-1 provoca um rápido aumento

do cálcio intra-celular e uma activação sustentada da proteína cínase C. Foram também demonstradas a activação precoce das isoformas p42/p44 da proteína cínase activada por mitogénios (MAPK) e a indução dos genes c-fos e c-jun (Davie e *Col.* 2004).

A inibição dos canais de potássio dependentes da voltagem (Kv) induz despolarização da membrana, o que aumenta a abertura de canais de cálcio dependentes da voltagem, aumentando o cálcio citosólico e iniciando a vasoconstrição (e a proliferação celular). A expressão do canal Kv1.5 está diminuída nas células musculares lisas das artérias pulmonares de doentes com HTP, bem como a expressão dos canais Kv1.5 e Kv2.1 em ratos com HTP induzida pela hipoxia crónica (Humbert e *Col.* 2004).

Na HTP, a serotonina (5-HT) plasmática está aumentada, enquanto que os níveis plaquetários estão diminuídos. A expressão e/ou actividade da serotonina nas células musculares lisas pulmonares contribuem para a remodelagem vascular que ocorre na HTP experimental e clínica. A 5-HT é codificada num gene único no cromossoma 17q11.2 e foi descrita uma variante a montante da região promotora do gene. Este polimorfismo com forma curta (C) ou longa (L), afecta a expressão de serotonina e a função, com o alelo L induzindo uma maior taxa de transcrição do gene do que o alelo C. Nas artérias pulmonares de grande calibre, o receptor 5-HT medeia a contracção induzida pela 5-HT. O receptor 5-HT<sub>1B</sub> foi identificado como mediador da contracção em artérias musculares pequenas. A expressão deste receptor está aumentada na HTP. Estudos moleculares confirmaram que o ARNm para o receptor 5-HT<sub>1B</sub> está aumentado em ratos com HTP induzida pela hipoxia crónica. Uma associação interessante entre a hipótese dos canais de K<sup>+</sup> e o papel da serotonina, é a descoberta de que os inibidores dos canais de K<sup>+</sup> provocam

libertação de serotonina e inibem as correntes de  $K^+$  nos megacariócitos. Adicionalmente, os anorexigénicos que inibem a recaptação da serotonina e induzem a sua libertação, são bloqueadores dos canais de  $K^+$  (Weir e Col. 1996). Isto levantou a hipótese de que a despolarização crónica das plaquetas e das células musculares lisas das artérias pulmonares poderia originar vasoconstrição e proliferação celular (Humbert e Col. 2004).

### ***Proliferação celular***

Uma característica comum a todas as formas de remodelagem na HTP é a extensão distal das células musculares lisas em direcção às artérias pulmonares periféricas habitualmente não musculares, até ao ácino respiratório. Adicionalmente, a característica identificativa da hipertensão pulmonar é a formação de uma camada de miofibroblastos e matriz extra-celular entre o endotélio e a lâmina elástica interna, chamada neoíntima. Os mecanismos que permitem a migração de fibroblastos da adventícia para a média (e em última análise, para a íntima) não são claros, mas existe evidência que sugere que ocorre aumento da expressão e actividade das metaloproteinases (MMP2 e MMP9) e que estas moléculas estão envolvidas nessa migração. Em várias formas de hipertensão pulmonar, à medida que a espessura do vaso aumenta, ocorre um aumento concomitante da neovascularização dos *vasa vasorum*, que podem constituir uma via para células progenitoras circulantes terem acesso à parede do vaso. Ainda é desconhecido se as células progenitoras circulantes derivadas da medula óssea contribuem directamente para o espessamento da adventícia e para o espessamento da média ou se simplesmente aumentam a actividade proliferativa e migratória dos fibroblastos da adventícia. Adicionalmente, a evidência mostra que a HTP pode estar associada a alterações da

taxa de proliferação e apoptose, que resultam em artérias pulmonares espessadas (Humbert e *Col.* 2004).

Os mecanismos moleculares subjacentes às alterações vasculares complexas que ocorrem na HTP, incluem alterações fenotípicas nas células endoteliais e nas células musculares lisas das artérias pulmonares hipertensivas, o que constitui um reconhecimento de que a proliferação celular contribui para as alterações estruturais associadas ao início e progressão da HTP. Constitui igualmente um reconhecimento do papel das proteínas da matriz e de renovação da matriz na remodelagem vascular e da importância das influências hemodinâmicas no processo da doença (Rosenzweig e *Col.* 2004). Em última análise, estímulos que aumentam a vasoconstrição, tais como a inibição dos canais de  $K^+$  e da ET-1, também causam proliferação celular (Humbert e *Col.* 2004). A acção mitogénica da ET-1 nas células musculares lisas ocorre através dos receptores tipo A (ET-A) ou tipo B (ET-B), dependendo da localização anatómica das células. Ocorre mitogénese mediada pelos receptores ET-A nas células derivadas da artéria pulmonar principal, enquanto que nas células das artérias de resistência, ambos os receptores podem estar implicados. Os níveis de ET-1 pulmonar e circulante estão aumentados em animais e doentes com HTP de várias etiologias (Giaid e *Col.* 1993), o que sugere o provável contributo da ET-1 para a remodelagem vascular pulmonar anormal, característica da doença (Humbert e *Col.* 2004).

### ***Alterações da coagulação***

A disfunção endotelial observada, leva à libertação de agentes quimiotáticos, que promovem a migração de células musculares lisas para a parede vascular, o que pode conduzir à hipertrofia e à hiperplasia da média vascular. Adicionalmente, a

disfunção endotelial, associada a excessiva libertação de mediadores trombogénicos, promove um estado pró-coagulante, o que provoca obstrução vascular adicional. Os níveis elevados de fibrinopéptido A em doentes com HTP idiopática, sugere que ocorre trombose *in situ*.

As lesões trombóticas e a disfunção plaquetária são potencialmente importantes na HTP. A coagulação intravascular é um processo contínuo nos doentes com HTP, caracterizado por aumento dos níveis plasmáticos de fibrinopeptídeo A e D-dímeros. Adicionalmente, as actividades procoagulante e fibrinolítica do endotélio pulmonar estão alteradas na HTP. Esta disfunção revela-se nos níveis plasmáticos elevados de factor von Willebrand e de inibidor do activador do plasminogénio tipo 1. O *shear stress* e a lesão dos vasos pulmonares geram uma superfície trombogénica. Há evidência crescente de que interacções entre as plaquetas e a parede arterial pulmonar pode contribuir para alterações estruturais e funcionais dos vasos pulmonares. Alterações vasculares na HTP podem levar à libertação plaquetária de vários factores pró-coagulantes, vasoactivos e mediadores mitogénicos, tais como o tromboxano A<sub>2</sub>, a serotonina, o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o factor de crescimento de transformação β (TGFβ) e o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF). No entanto, na maioria dos casos não é claro se a trombose e a disfunção plaquetária são causas ou consequências da doença (Humbert e Col. 2004).

### ***Angiogénese e apoptose***

O VEGF é um mitogénio angiogénico específico das células endoteliais que actua através de 2 receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2). Foi proposto que o VEGF suporta a manutenção e a sobrevivência do endotélio pulmonar. Na HTP, a expressão

de VEGF nos vasos pulmonares (incluindo lesões plexiformes) está aumentada (Tuder e Col. 2001). Embora a isoforma VEGF-A tenha sido a mais extensamente estudada na HTP e tenha sido proposto um papel protector, um estudo recente identificou um papel patogénico para o VEGF-B (Humbert e Col. 2004). Ao contrário do VEGF-A, o VEGF-B parece exacerbar a remodelagem vascular, uma vez que, o rato VEGF-B<sup>-/-</sup> exposto a hipoxia crónica, evidencia menos remodelagem vascular, comparado com o VEGF<sup>+/+</sup> (Wanstall e Col. 2002). A transferência do gene VEGF provou ser eficaz na prevenção do desenvolvimento e da progressão da HTP no modelo da monocrotalina (Campbell e Col. 2001). O VEGF evitaria a perda de vasos existentes ou induziria o desenvolvimento de novos vasos no pulmão, o que minimizaria a progressão da doença (Campbell e Col. 2001). Na HTP idiopática, a expressão de VEGFR-1 está aumentada, enquanto que nas lesões plexiformes é expresso o VEGFR-2. Em ratos, foi demonstrado que a combinação do bloqueio crónico do VEGFR-2 e a hipoxia crónica, podiam causar disfunção endotelial pulmonar e morte celular, permitindo a selecção de um fenótipo endotelial resistente à apoptose e o subsequente desenvolvimento de HTP grave (Taraseviciene-Stewart e Col. 2001). Uma vez que a morte das células endoteliais, a proliferação celular e o desenvolvimento de HTP grave podiam ser bloqueados por um inibidor da caspase, a selecção de uma célula endotelial resistente à apoptose podia ser o evento crucial responsável pela proliferação de células endoteliais pulmonares (Taraseviciene-Stewart e Col. 2001).

Em muitos casos de HTP está descrita proliferação endotelial monoclonal, desorganizada, conduzindo à formação de lesões plexiformes. As células que constituem as lesões plexiformes são canais endoteliais suportados por um estroma contendo proteínas da matriz e miofibroblastos. As células endoteliais expressam

marcadores de angiogénese como o VEGF e seus receptores. Alterações nos genes supressores do crescimento têm sido descritas em lesões plexiformes de doentes com HTP idiopática, incluindo o receptor 2 do TGF-beta (TGF- $\beta$ R2) e o gene Bax, relacionado com a apoptose. Em aproximadamente 30% das lesões plexiformes há uma mutação no TGF- $\beta$ R2, codificando para um codão stop prematuro. Além disso, em 90% das lesões plexiformes, a proteína TGF- $\beta$ R2 não é expressa, em contraste com a expressão abundante nas células endoteliais que não pertencem a estas lesões. O estímulo iniciador pode incluir hipóxia, *shear stress*, infecção por vírus vasculotrópico (Human herpesvirus-8), inflamação, resposta a drogas ou toxinas num indivíduo com susceptibilidade genética (Humbert e *Col.* 2004).

Crianças com HTP têm mais hipertrofia da média vascular e menos fibrose da íntima e menos lesões plexiformes que o adulto (Rosenzweig e *Col.* 2004). No estudo clássico de Wagenvoort e Wagenvoort, em 1970, entre 11 crianças com menos de 1 ano, todas tinham hipertrofia de média vascular, apenas 3 tinham fibrose da íntima e nenhuma tinha lesões plexiformes. Com o aumento da idade, a fibrose da íntima e as lesões plexiformes eram encontradas com mais frequência. Estes estudos *post mortem* sugerem que a vasoconstrição pulmonar, conduzindo a hipertrofia da média, pode ocorrer precocemente no curso da doença e pode preceder o desenvolvimento de lesões plexiformes e outras alterações vasculares permanentes.

A angiopoietina-1 (ang-1) é um factor angiogénico essencial para o desenvolvimento vascular pulmonar (Du e *Col.* 2003). A ang-1 é produzida pelas células musculares lisas e pelos pericitos percursores e estabiliza o desenvolvimento de vasos sanguíneos recrutando células musculares. O receptor para a angiopoietina TIE2 está presente apenas no endotélio vascular. A interacção entre a

angiopoietina produzida pelas células musculares lisas e o receptor TIE2 durante o desenvolvimento induz a proliferação de células musculares à volta da rede endotelial vascular. Depois de terminado o desenvolvimento, a angiopoietina-1 é expressa a um nível mínimo no pulmão humano. Du e colaboradores sugerem que todas as formas de HTP não familiar são caracterizadas pelo aumento da expressão da angiopoietina-1 e fosforilação do TIE2, correlacionadas directamente com a gravidade da doença. Uma ligação entre a HTP familiar e a HTP adquirida é suportada pela descoberta de que a angiopoietina-1 bloqueia a expressão do BMPR1A, uma proteína transmembranar necessária à sinalização do BMPR2 nas células endoteliais arteriolares pulmonares. Adicionalmente, a angiopoietina-1 estimula as células arteriolares pulmonares, através da via TIE2 para produzir e secretar 5-HT. Estes dados sugerem que a vasculopatia pulmonar hipertensiva ocorre através de uma via parácrina ang-1/TIE2/5-HT. Pelo contrário, Zhao colaboradores, em 2003 demonstraram que a ang-1 pode ter um papel protector pelo menos em algumas formas de HTP. Neste estudo, a transferência génica de ang-1 melhorou a sobrevida e a hemodinâmica na HTP induzida pela monocrotalina, através de um mecanismo de inibição da apoptose e protecção da microvasculatura pulmonar. Estas duas abordagens do papel da ang-1 reflectem perspectivas diferentes do mecanismo de doença. Por um lado, os investigadores assumem que o efeito celular primário é a hiperplasia das células musculares lisas e que isto é mediado pela ang-1. Por outro lado, coloca-se a hipótese da apoptose endotelial estar subjacente à progressão da doença e que esta pode ser evitada pela administração de ang-1 (Humbert e *Col.* 2004).

Outros factores incluindo o PDGF, o factor de crescimento fibroblástico básico, o factor de crescimento tipo 1 semelhante à insulina (IGF-1), o factor de crescimento

epidérmico, foram implicados na remodelagem vascular e estão aumentados na doença pulmonar hipertensiva. O mecanismo subjacente ainda não é claro, mas espécies reactivas de oxigénio parecem estar implicadas, uma vez que o peróxido de hidrogénio induz a expressão de PDGF no endotélio pulmonar humano, tal como a hipoxia e o stresse mecânico (Humbert e *Col.* 2004).

### ***Mutações do “bone morphogenic protein receptor type 2”***

A identificação no cromossoma 2q33, do gene PPH1 para a HTP idiopática familiar levanta a possibilidade de que este possa causar ou contribuir para a lesão vascular pulmonar (Deng 2000). Foram identificadas mutações do *bone morphogenic protein receptor type 2* (BMPR2). As BMP (proteínas morfogénicas ósseas), via activação do BMPR2, são fundamentais na diferenciação e crescimento celulares do embrião de galinha, através de uma complexa cascata de sinalização intra-celular. A disrupção dirigida do BMPR2 causa paragem do desenvolvimento logo após a implantação e ausência completa das estruturas mesodérmicas (Dees e Baldwin. 2002).

Mutações do gene BMPR2 foram identificadas em 60% dos casos de HTP familiar e em 10-30% dos casos idiopáticos (Lane e *Col.* 2000; Thomson e *Col.* 2000). Embora a penetrância seja de apenas de 20%, a ligação entre mutações BMPR2 e HTP é reforçada pelo facto de, independentemente da mutação BMPR2, todos os doentes com HTP idiopática e alguns com HTP secundária, terem diminuição da expressão proteica de BMPR2 (Atkinson e *Col.* 2002). Adicionalmente, uma diminuição no co-receptor BMP-Ria é observada frequentemente em doentes com HTP idiopática (Du e *Col.* 2003). A consequência funcional da redução ou ausência de BMPR2 nas células endoteliais e musculares

lisas está a ser investigada. Estudos de Morrell e colaboradores, em 2001, mostraram que as células musculares lisas de doentes com HTP idiopática (com ou sem mutação *BMPR2*) proliferam em resposta ao  $TGF\beta 1$  e à *BMP2*, em oposição ao que acontece em doentes com pressão pulmonar normal (inibição da proliferação com estes ligandos nas células musculares lisas). A última está, em parte, relacionada com a apoptose das células musculares lisas (Zhang e *Col.* 2003.). Estudos recentes mostraram que a *BMP4* induz diferenciação de fibroblastos pulmonares fetais em células musculares lisas e inibe a sua proliferação (Jeffery e *Col.* 2005), sugerindo que a ausência de *BMPR2* pode expandir esta população celular na doença. Também foi demonstrado que normalmente o *BMP4* suprime a proliferação das células musculares lisas das artérias pulmonar proximal e promove a proliferação a nível distal, mas em doentes com HTP, as células musculares lisas da artérias pulmonares proximais também proliferam, em resposta ao *BMP4* (Yang e *Col.* 2005). Num estudo experimental recente, a deleção do *BMPR2* em cultura de células musculares lisas de artéria pulmonar, resultou em aumento da função de sinalização através do receptor *Ila* da activina em conjugação com redução da sinalização das *BMP 2* e *4* e um aumento da sinalização das *BMP 6* e *7* (Yu e *Col.* 2005). Alterações na expressão de *BMPR2* e *BMPR1a*, na disponibilidade de ligandos tais como as *BMP 2*, *4*, *7*, ou na cascata de eventos de sinalização que influenciam a expressão genética, podem contribuir para o desenvolvimento de HTP (Nishihara e *Col.* 2002). Machado e colaboradores descreveram 26 mutações de *BMPR2* diferentes em 23 famílias (de 47 estudadas) e em 3 indivíduos com doença esporádica (Machado e *Col.* 2001).

A identificação dos mecanismos moleculares, permitirá delinear novos métodos de diagnóstico e monitorização bem como estratégias terapêuticas, que permitirão uma intervenção mais eficaz na HTP (Rosenzweig e *Col.* 2004).

#### **MODELO DA MONOCROTALINA**

A monocrotalina (MCT) é obtida de sementes de *Crotalaria spectabilis* (Ito e *Col.* 2000). É um alcalóide pirrolizidina inactivo e sofre biotransformação hepática em metabolitos tóxicos (Ito e *Col.* 2000). Tem um tempo de eliminação de 24 horas (Tatebe 1996). O tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ -vida) dos metabolitos da MCT é de 3 segundos, o que implica que afectam principalmente o endotélio das artérias pulmonares, pelo que tem sido utilizada para induzir HTP em modelos animais experimentais adultos. A gravidade da lesão pulmonar é dependente da dose, sendo que doses altas provocam edema pulmonar e morte, enquanto que doses baixas provocam HTP sustentada, hipertrofia das paredes arteriais, proliferação endotelial e inflamação perivascular (Tatebe 1996).

O mecanismo pelo qual a MCT actua é por vasculite pulmonar, diminuição do metabolismo da 5-HT e diminuição da recaptção da noradrenalina nos pulmões, o que provoca vasoconstrição (Gillis e *Col.* 1978), aumento da reactividade pulmonar (Rabinovitch e *Col.* 1979), obstrução mecânica por trombos plaquetários, lesão endotelial directa e degradação de proteínas do tecido conjuntivo da parede vascular (Todorovish-Hunter e *Col.* 1988).

Todd e colaboradores descreveram um modelo de HTP induzida pela MCT (Tabela 2), administrando MCT, 60 mg/Kg, subcutânea em dose única (Todd e *Col.* 1985), evidenciando que os animais apresentavam peso inferior ao dos controlos, aumento do volume pulmonar, hipertrofia do VD (significativa 4 semanas pós-

injecção, ausência de regressão do peso do VD no grupo infantil e aumento progressivo nos adultos). No que respeita ao crescimento e desenvolvimento vascular pulmonar, a MCT induziu extensão de músculo para as artérias periféricas e hipertrofia da média das artérias musculares (Todd e Col. 1985).

No grupo neonatal, ocorreu diminuição acentuada no desenvolvimento alveolar por atingimento do período crítico de desenvolvimento alveolar (3-8 dias). A diminuição acentuada do número de alvéolos (1/3 do normal) conduziu à diminuição do número absoluto de artérias e isto foi causa provável de morte.

No grupo infantil, a proliferação vascular pulmonar (8-11 dias) não foi afectada pela MCT (Todd e Col. 1985).

**Tabela 2 – Modelo animal de hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina**

	Neonatais (3 dias)	Infantis (8 dias)	Adultos (8 semanas)
2s	Ø HVD e alterações vasculares pulmonares significativas		
	↓↓ Desenvolvimento alveolar	Desenvolvimento alveolar normal	
	Extensão de músculo para as artérias periféricas, hipertrofia da média das artérias musculares		
	Mortalidade= 20%	Mortalidade= 0%	Mortalidade= 0%
>4s	Mortalidade=100%	↓ Hipertrofia da média ↑ Tamanho da artéria Ø Regressão do peso do VD	↑ Hipertrofia do VD HVD

VD, ventrículo direito; HVD, hipertrofia do VD; s, semanas.

Rosenberg e Rabinovitch (Tabela 3), estudaram o papel da lesão endotelial e da reactividade vascular pulmonar na patogénese da HTP induzida pela MCT, 60 mg/Kg (modelo adulto). Os dados hemodinâmicos foram correlacionados com

análises do endotélio vascular avaliado por microscopia electrónica (ME) e a muscularização das artérias pulmonares por microscopia óptica (ML).

**Tabela 3 – Correlação entre histologia e hemodinâmica no modelo animal de HTP induzida pela MCT**

Tempo pós-injecção MCT (dias)				
		4	8	12
Microscopia		↑ volume das mitocôndrias	↑% artérias muscularizadas ao nível dos ductos alveolares	↑ Extensão periférica de músculo liso nas artérias que acompanham ductos alveolares
		↓microfilamentos ↑célula endotelial		
Morfometria		PesoVD/Peso corporal igual em todos os grupos		
			↑ PesoVE/Peso corporal (controlo= MCT)	
Hemodinâmica		Pressão (Pap) e resistência (Rap) na artéria pulmonar normal no grupo MCT e controlo		↑Pap basal no grupo MCT ↑ ↑ Pap em resposta à hipóxia no grupo MCT

## DIAGNÓSTICO DE HIPERTENSÃO PULMONAR

Deve ser realizada uma história clínica e um exame físico detalhados, bem como exames auxiliares de diagnóstico. Os sintomas iniciais são muito inespecíficos. Os lactentes frequentemente apresentam sinais de baixo débito cardíaco, tais como recusa alimentar, mau desenvolvimento estaturó-ponderal, hipersudorese, taquipneia, taquicardia e irritabilidade. Algumas crianças têm crises de choro, presumivelmente como resultado da dor torácica. As crianças podem desenvolver dispneia causada pela diminuição da oxigenação tecidual durante o exercício devido à incapacidade de aumentar o débito cardíaco na presença de necessidades de oxigênio aumentadas, cianose com o exercício, devido ao *shunt* direito-esquerdo através do *foramen ovale* patente (FOP). Este funciona como válvula de escape para o coração direito hipertensivo. Crianças sem *shunt* adequado através do FOP podem apresentar-se com síncope devido a incapacidade de adequar o débito cardíaco ao exercício. A síncope ocorre mais frequentemente em crianças que em adultos, frequentemente com o exercício e implica débito cardíaco muito limitado com diminuição da perfusão cerebral. A vasodilatação periférica durante o exercício agrava esta situação. O intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico é menor nas crianças do que nos adultos, principalmente naquelas que se apresentam com síncope. Em crianças mais velhas, os sintomas mais frequentes são a dispneia de esforço e ocasionalmente a dor torácica, que resulta de isquemia ventricular direita. Sintomas de insuficiência ventricular direita são mais frequentes em crianças com mais de 10 anos e com HTP grave e de longa duração (Rosenzweig e Col. 2004).

Ao exame físico, deve prestar-se especial atenção ao exame cardíaco e aos sinais de congestão venosa sistêmica relacionados com insuficiência ventricular

direita. Os sinais de pressão sistólica ventricular elevada incluem um P2 aumentado (pode deixar de o ser à medida que o ventrículo direito se torna insuficiente), sopro pansistólico de insuficiência tricúspide (muito frequente) e sopro diastólico de insuficiência pulmonar. Adicionalmente pode existir um S3 ou S4 ventriculares direitos. A turgescência venosa jugular, embora rara em crianças, pode estar presente, com uma onda a proeminente. A hepatomegalia pode estar presente e é um bom marcador do grau de insuficiência cardíaca direita e da resposta à terapêutica. Nos casos mais graves pode surgir ascite e edema periférico (Rosenzweig e *Col.* 2004). Os sons pulmonares são habitualmente normais (Galiè e *Col.* 2004). Outros sinais sistémicos podem ser indicativos da causa de HTP (Rosenzweig e *Col.* 2004).

O ecocardiograma é o meio auxiliar de diagnóstico mais frequentemente usado na HTP. Por um lado possibilita o diagnóstico de cardiopatias congénitas que possam ser causa de HTP e por outro, a avaliação da velocidade do fluxo de regurgitação tricúspide permitindo estimar a pressão no VD (Tulloh 2006).

O cateterismo cardíaco é necessário para confirmar o diagnóstico de HTP, permitindo também a quantificação dos efeitos da terapêutica nas resistências vasculares pulmonares (Hoehn 2007).

### **OPÇÕES TERAPÊUTICAS ACTUAIS**

Em 1977, Wagenvoort e Wagenvoort admitiram que a HTP idiopática era uma doença de indivíduos com vasos pulmonares hiperreactivos, nos quais vários estímulos iniciavam vasoconstrição com subsequente desenvolvimento de lesões vasculares características. O tratamento desta doença nasceu desta hipótese, isto é, procurando o vasodilatador pulmonar ideal.

O efeito vasodilatador do oxigénio tem sido utilizado em crianças com o objectivo de reduzir as resistências vasculares pulmonares, no entanto a hiperóxia está contra-indicada nos recém-nascidos pré-termo devido ao risco de retinopatia da prematuridade (Hoehn 2007).

A PGI<sub>2</sub> é, conforme já descrito, um vasodilatador potente da circulação sistémica e pulmonar. A terapêutica com PGI<sub>2</sub> melhorou o estado clínico, a hemodinâmica e a sobrevida dos doentes com HTP grave (Humbert e *Col.* 2004).

Dado o efeito não selectivo da PGI<sub>2</sub>, tornou-se necessário o desenvolvimento de um análogo, o iloprost, que pode ser nebulizado e conseqüentemente, actua predominantemente na circulação pulmonar (Hoehn 2007). O iloprost inalado pode reverter a HTP e a remodelagem vascular pulmonar induzida pela MCT, mas ocorre tolerância (Schermyly e *Col.* 2006). Outra desvantagem da PGI<sub>2</sub> consiste no seu tempo de semi-vida curto (6 minutos) e a necessidade de cateter venoso central para administração contínua. Assim surgiu o análogo treprostinil, que tem uma semi-vida de 3 horas e que pode ser administrado por via subcutânea (McLaughlin e *Col.* 2003), no entanto, a experiência em crianças é limitada (Hoehn 2007).

O NO causa vasodilatação pulmonar não só em adultos, mas também em recém-nascidos. Em 14 estudos aleatorizados, o principal efeito do NO foi a diminuição significativa de doentes que necessitaram de oxigenação por membrana extracorporal (ECMO) (Finer e Barrington. 2006).

O bosentan é um inibidor não selectivo dos receptores ET-A, ET-B. Nos modelos animais previne e reverte a HTP induzida pela hipoxia (Chen e *Col.* 1995) e pode prevenir parcialmente a HTP induzida pela MCT (Hill e *Col.* 1997; Lourenço e *Col.* 2006). Dados retrospectivos de crianças tratadas com bosentan, sugerem segurança e eficácia (Rosenzweig e *Col.* 2005).

O tratamento com sildenafil, aumenta a vasodilatação pulmonar dependente do NO, inibindo a degradação do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) pela fosfodiesterase tipo 5 (Humbert e *Col.* 2004). O sildenafil inibe o desenvolvimento de HTP em modelos animais de HTP (Schermuly e *Col.* 2005). Dados pediátricos sugerem um efeito benéfico do sildenafil oral, a nível hemodinâmico e da capacidade de exercício em crianças com HTP (Humpl e *Col.* 2005). O sildenafil usado por via endovenosa mostrou ser tão eficaz como o NO na diminuição da resistência vascular pulmonar em crianças com cardiopatia congénita (Schulze-Neick e *Col.* 2003). Infelizmente, o número de crianças incluídas nestas séries de casos é insuficiente para tirar conclusões fiáveis (Hoehn 2007).

Os testes de vasodilatação pulmonar em crianças implicam alguma precaução, porque a reactividade vascular pulmonar é maior e portanto maior o risco de crise pulmonar hipertensiva. É recomendado que todas as crianças sejam submetidas a um teste com um vasodilatador pulmonar de curta acção, na altura do cateterismo cardíaco inicial. Os vasodilatadores recomendados para vasodilatação aguda são o epoprostenol endovenoso (2-12 ng/Kg/min), o NO inalado (10-80 partes/milhão) e/ou adenosina endovenosa (50-200 ng/Kg/minuto) e o iloprost inalado (14-17 µg). Embora quanto mais jovem for a criança à data do diagnóstico, maior a probabilidade dela responder aos testes agudos, há um grande espectro de variabilidade. Doentes que respondem aos testes de vasodilatação aguda provavelmente terão uma resposta favorável aos testes com bloqueadores dos canais de cálcio e subsequentemente à terapêutica com bloqueadores dos canais de cálcio orais. A nifedipina, um bloqueador dos canais de cálcio, é um dos fármacos mais antigos usados no tratamento da HTP, embora apenas uma minoria de crianças responda favoravelmente (Tulloh 2006).

A HTP continua a ser alvo de intensa investigação, quer experimental, quer clínica, uma vez que os resultados a longo prazo, com as terapêuticas disponíveis actualmente, são ainda pouco satisfatórios. Especificamente em relação à HTP pediátrica, os avanços são muito mais difíceis e morosos dado que os ensaios clínicos são de implementação mais complexa.

#### **PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS FUTURAS**

Relativamente a novas terapêuticas para a HTP, foi descrito que a Ghr, um libertador endógeno da hormona de crescimento e um potente vasodilatador, atenua a remodelagem vascular pulmonar e a hipertrofia VD no modelo de HTP adulta induzida pela MCT (Henriques-Coelho e *Col.* 2004; Leite-Moreira e Soares. 2007).

Kojima e *Col.*, em 1999, identificaram a grelina, cujo nome deriva da língua Indo-Europeia “*ghre*”, que significa “crescer”, uma vez que desempenha um papel importante na libertação da hormona de crescimento (HC). A Ghr, uma hormona produzida principalmente pelo estômago, mas também no VD e pulmão (Henriques-Coelho 2004; Papotti e *Col.* 2000) foi identificada originalmente como o ligando endógeno do *growth hormone secretagogue receptor* (GHSR). Os GHSR estão presentes noutros tecidos além do hipotálamo e da hipófise, o que indica que a grelina tem outros efeitos além da estimulação da libertação da hormona de crescimento (Leite-Moreira e Soares, 2007). O gene que codifica para a preprorelina humana, que está localizado no cromossoma 3p25-26, consiste em 5 exões e 4 intrões. O ARNm é traduzido no precursor preprorelina com 117 aminoácidos, que é subsequentemente clivado, originando a Ghr. A Ghr é composta por 28 aminoácidos, que sob acção de uma acil-transferase não identificada, é sujeita a uma esterificação única, que é essencial para a ligação ao GHS-R1. A des-

acil-grelina constitui a maior parte da grelina circulante e actua independentemente do receptor GHS-R1a, desencadeando efeitos vasodilatadores e cardiotrópicos benéficos (Leite-Moreira e Soares. 2007). O efeito vasodilatador da Ghr parece ser independente do endotélio e da HC (Nagaya e *Col.* 2001; Wiley e *Col.* 2002).

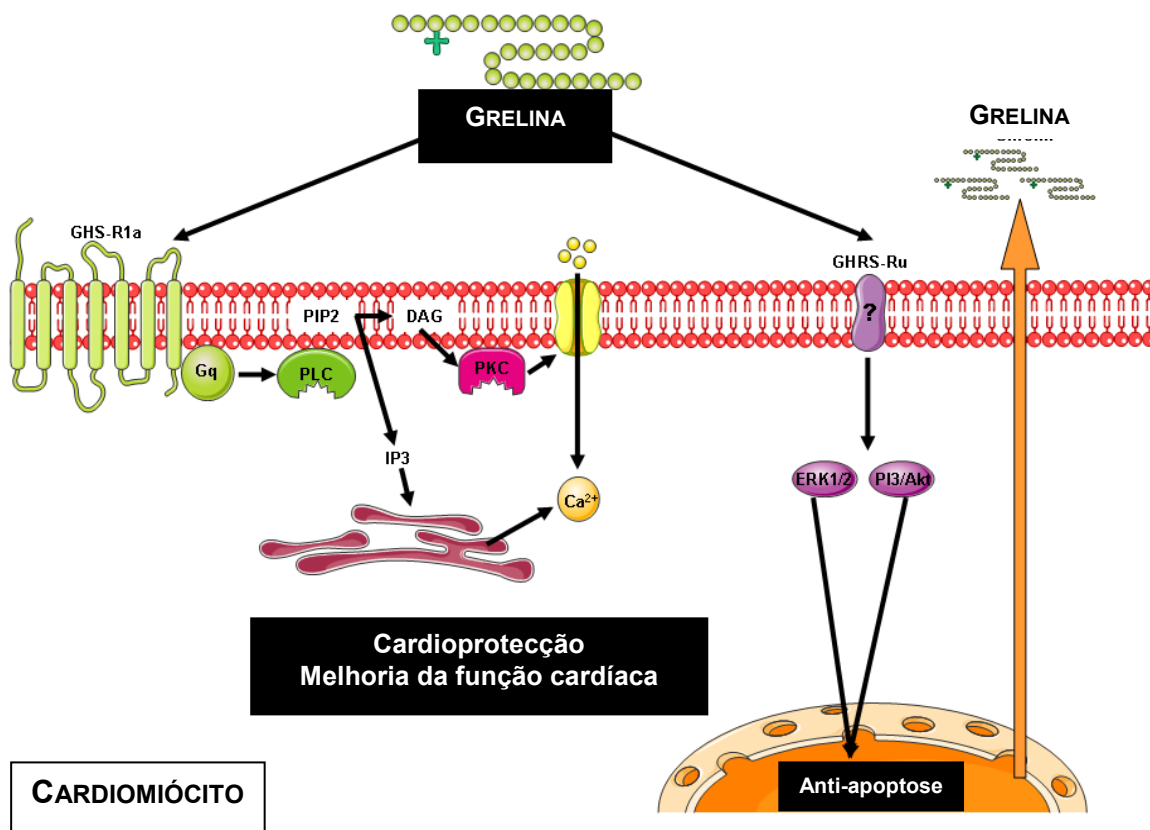


Figura 1 (Adaptada de Leite-Moreira e *Col.* 2008) – Vias de acção da Ghr a nível miocárdico. A activação do GHSR1a pela Ghr estimula a proteína G que activa a via sinalizadora da fosfolípase C (PLC), produzindo inositol (1,4,5) trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 e o DAG levam a um aumento do Ca<sup>2+</sup> miocárdico via estimulação do influxo de Ca<sup>2+</sup> através de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes da voltagem e da sua libertação a partir do retículo sarcoplasmático. Um receptor hipotético, o GHS-Ru, com estrutura desconhecida medeia os efeitos da Ghr na sobrevivência dos miócitos através da activação da cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) e da Posfatidilinositol 3-OH-Cínase (Baldanzi e *Col.* 2002). A Ghr também é sintetizada e secretada pelos cardiomiócitos provavelmente com efeito parácrino/autócrino (Iglesias e *Col.* 2004).

Evidência crescente apoia o papel da Ghr na regulação directa da função cardiovascular. A expressão do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) que codifica para a grelina e seu receptor, foi observado no coração e vasos sanguíneos. Numerosos estudos recentes indicam que o miocárdio animal e humano possui múltiplos subtipos de GHSR, diferentes do GHSR-1a clássico, com afinidades diferentes para as várias GHS e que podem contribuir independentemente para a miríade de actividades cardiovasculares da GHS. Os efeitos cardiovasculares benéficos podem estar associados ao aumento da hormona de crescimento, do apetite, da vasodilatação e à diminuição nas citocinas, bem como a efeitos directos nas células musculares cardíacas (Leite-Moreira e Soares. 2007). Finalmente, a administração de grelina afecta vários aspectos do leito vascular e da função cardíaca em diferentes condições experimentais (Leite-Moreira e Soares. 2007).

No que diz respeito à macrocirculação, os efeitos vasoactivos da grelina dependem do território vascular. A grelina tem um efeito vasodilatador sistémico que é independente do endotélio e que pode envolver mecanismos periféricos e centrais. De facto, a administração endovenosa de Ghr em humanos, diminui significativamente a pressão arterial média, mas não altera a frequência cardíaca. Recentemente foi demonstrada, uma associação entre polimorfismos nos genes que codificam para a Ghr e a pressão arterial e entre níveis baixos de grelina e hipertensão arterial, o que indica que a Ghr pode ter um papel na fisiopatologia da hipertensão arterial. Por outro lado, a Ghr aumenta a perfusão coronária no coração de ratos e aumenta significativamente o tonus miogénico induzido pela pressão, nas arteríolas coronárias. Na microcirculação, a Ghr aumenta o fluxo vascular (Leite-Moreira e Soares. 2007). A Ghr também melhora a função endotelial, pela inibição da produção de citocinas quimiotáticas (basal e induzida pelo TNF $\alpha$ ), aumentando a

bioactividade do NO e inibindo a migração das células endoteliais aórticas induzida pela angiotensina II. Assim, a Ghr pode opor-se à disfunção endotelial e ser útil no tratamento de patologias que lhe estão associadas (Leite-Moreira e Soares. 2007).

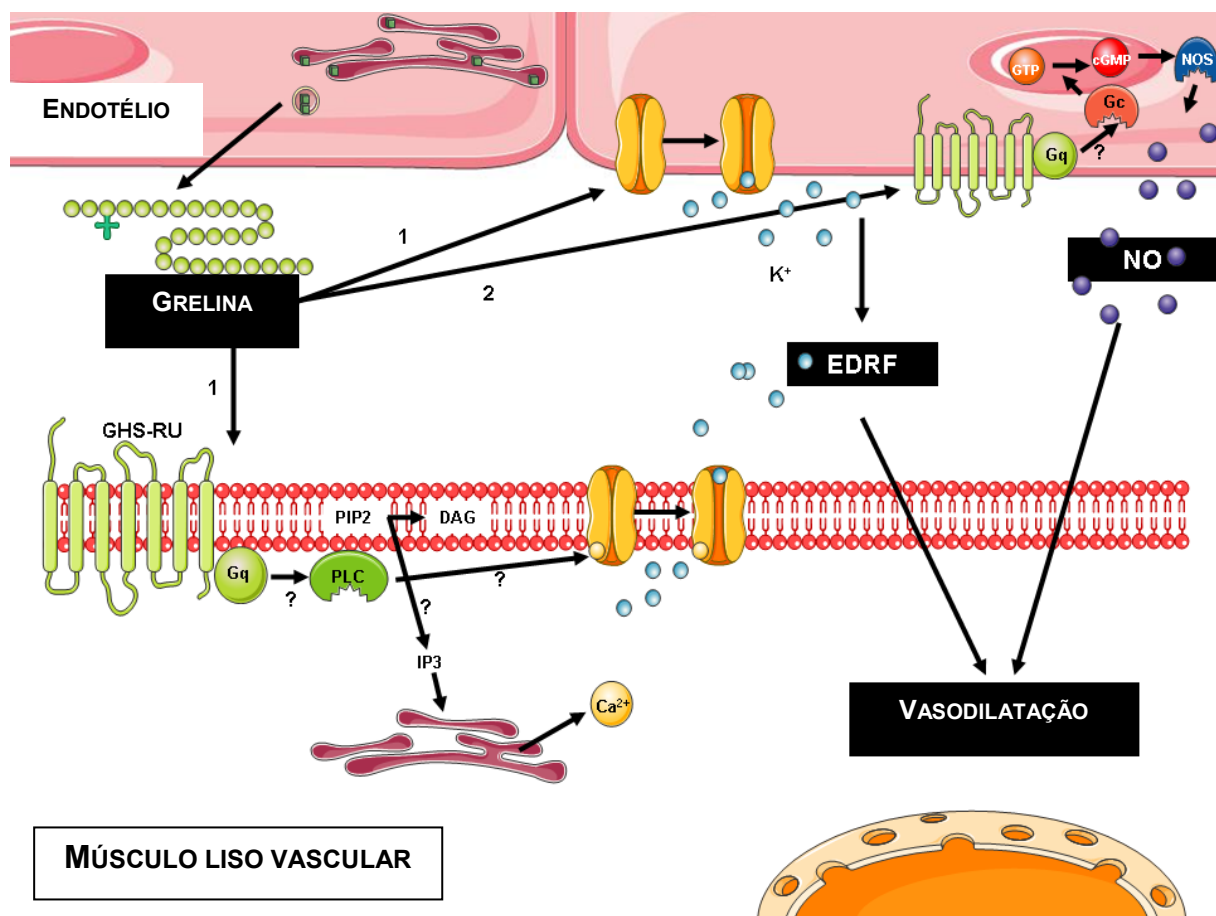


Figura 2 (Adaptada de Leite-Moreira e Col. 2008) – No músculo liso vascular, a Ghr provoca vasodilatação através de duas vias independentes do GHSR1a. A Ghr estimula um receptor desconhecido (GHS-Ru) que, através de uma via acoplada à proteína G, encerra os canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes do K<sup>+</sup>, do endotélio ou das células musculares lisas – via 1 (Shinde e Col. 2005). Outra via para que ocorra relaxamento muscular é a estimulação de um sistema acoplado à proteína G, com activação da guanilciclase (Gc). Isto vai aumentar a produção de GMPc com consequente indução da síntese do NO, promovendo vasodilatação mediada pelo NO – via 2 (Shimizu e Col. 2003).

## PROGNÓSTICO

A HTP tem um curso insidioso, com mau prognóstico, se não for diagnosticada e tratada precocemente (Rosenzweig e *Col.* 2004). A sobrevida média é pior (10 meses) nas crianças com HTP primária do que para a globalidade dos doentes (2,8 anos) com HTP primária (D'Alonzo e *Col.* 1991). A sobrevida média depende da etiologia, sendo pior na HTP primária e melhor no Síndrome de *Eisenmenger* (Galiè e *Col.* 2004).

A elevação dos níveis de BNP (peptídeo natriurético tipo B) foi associada com o aumento da mortalidade, enquanto doentes com diminuição dos níveis de BNP após tratamento com PGI<sub>2</sub> sobrevivem mais tempo que aqueles em que não há diminuição desses níveis (Haworth 2007). Baptista e colaboradores demonstraram que, em crianças com HDC, a elevação precoce do N-terminal-pro-BNP parece estar associada a um pior prognóstico (Baptista e *Col.* 2008). Assim, o BNP é considerado um biomarcador de disfunção ventricular direita útil, mas o seu papel na fisiopatologia da HTP ainda não é conhecido. A sua produção é estimulada pelo aumento da pressão e/ou sobrecarga de volume, em consequência do aumento do stress sobre a parede miocárdica. O VD hipertrofiado de ratos a quem foi administrada monocrotalina, mostraram um aumento selectivo de 15 vezes do BNP. A sua síntese também pode ser aumentada pela ET-1 e pela angiotensina-II, que desempenham um papel importante na fisiopatologia da doença vascular pulmonar (Haworth 2007). À excepção das crianças que respondem bem à terapêutica vasodilatadora crónica ou à PGI<sub>2</sub>, o único tratamento que pode ser oferecido é o transplante, disponível apenas para doentes seleccionados e com resultados nem sempre favoráveis, o que torna necessário otimizar o tratamento médico (Haworth 1998; Diller e Gatzoulis. 2007).

## OBJECTIVOS

Os seguintes constituíram objectivos da presente dissertação.

1. Estabelecer um modelo infantil de HTP induzida pela monocrotalina (MCT) no rato, que incluiu:
  - a. Titulação da dose de MCT
  - b. Avaliação de parâmetros morfométricos
    - i. Ventrículo direito
    - ii. Ventrículo esquerdo
    - iii. Razão ventrículo direito/ventrículo esquerdo
    - iv. Pulmão
2. Caracterizar a hemodinâmica biventricular em animais normais e com HTP, com avaliação dos seguintes parâmetros:
  - a. Pressão sistólica máxima
  - b. Pressão diastólica mínima
  - c. Pressão telediastólica.
  - d. Velocidades máximas de elevação da pressão ( $dP/dt_{max}$ )
  - e. Velocidades máximas de queda da pressão ( $dP/dt_{min}$ )
  - f. Velocidade de relaxamento
3. Avaliar os efeitos morfométricos e hemodinâmicos da administração de grelina no modelo animal de HTP pediátrica induzida pela MCT.

# MÉTODOS

## DESENHO DO ESTUDO

As experiências com animais foram realizadas de acordo com a Lei Portuguesa para o bem-estar animal e de acordo com o *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Pub. Nº 85-23, revisto em 1996). Ratos *Wistar* (Charles River Laboratories; Barcelona, Espanha) foram alojados num ambiente controlado sob ciclos de 12 horas de luz/escuridão, com temperatura ambiente de 22°C, sem restrições de água ou alimento.

Com o objectivo de definir um modelo de HTP induzida pela MCT, foi usada inicialmente a dose de 60 mg/Kg, no entanto, a mortalidade 21 dias após administração de MCT, era de 100%, pelo que foi necessário titular a dose de MCT com 50 mg/Kg (mortalidade de 100% aos 21 dias) e finalmente 30 mg/Kg.

Para avaliar os efeitos morfométricos e hemodinâmicos da administração de Ghr, os ratos receberam em dia 8 (D8), aleatoriamente, uma injeção subcutânea de MCT (30 mg/Kg peso corporal, Sigma<sup>®</sup>, Barcelona, Espanha) ou igual volume de veículo (Figura 3). Em dia 7 após administração de MCT (dia 15 de vida), os animais foram aleatorizados para administração de Ghr (100 µg/Kg, *bid*, durante 2 semanas, subcutânea) ou igual volume de veículo (soro fisiológico, SF). Desta forma, obteve-se um grupo controlo (controlo, n=10), um grupo a quem foi administrada MCT aos 8 dias de idade e que após 7 dias recebeu SF (MCT-SF, n=8) e um grupo a quem foi administrada MCT aos 8 dias de idade e que 7 dias depois recebeu Ghr (MCT-Ghr, n=10).



Figura 3 – Injecção de rato *Wistar* com 8 dias de vida

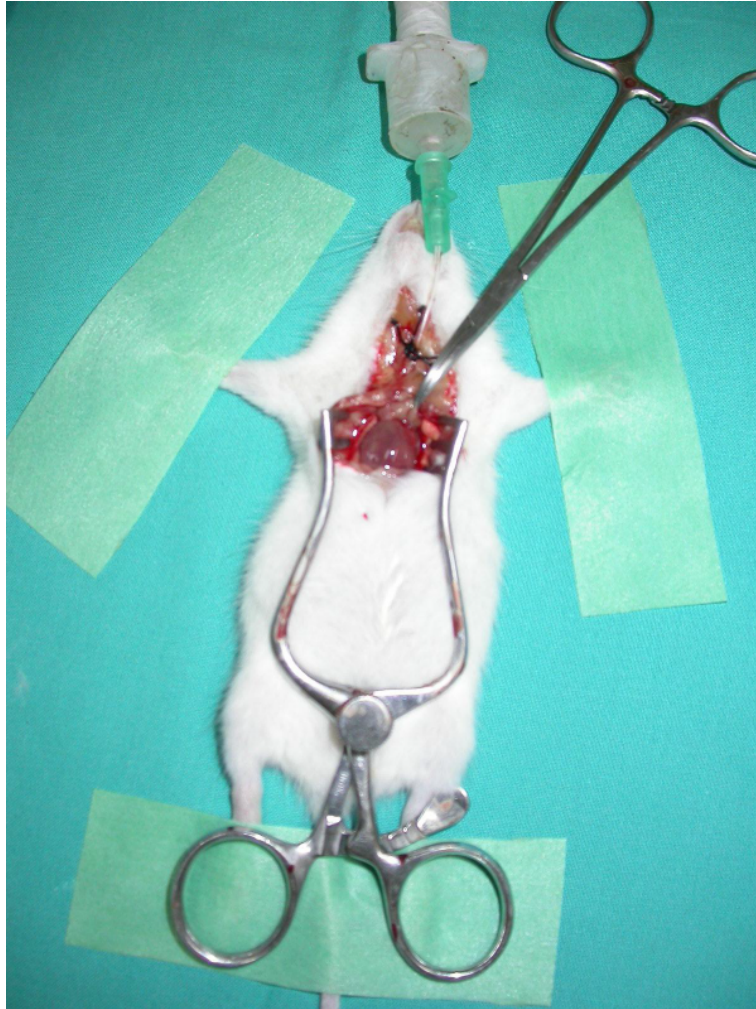
Tabela 4 – Desenho do estudo

Grupo	n			
D de vida		D8	D15	D29
D pós-MCT		D0	D7	D21
<b>Ctrl</b>	10			
		↑		
		<b>Veículo</b>		
<b>MCT</b>	8			
		↑		
		<b>MCT</b>		
			↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	
			<b>Veículo</b>	
<b>MCT-Ghr</b>	10			
		↑		
		<b>MCT</b>		
			↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	
			<b>Grelina</b>	

Ctrl, controlo; MCT, monocrotalina; MCT-Ghr, monocrotalina-grelina.

## ANÁLISE DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (6 mg/100g, intra-peritoneal) e a anestesia foi mantida com *bolus* de pentobarbital (2 mg/100g) conforme necessário. Durante a intervenção foi utilizada uma placa de aquecimento, para manutenção da temperatura corporal. Os animais foram traqueostomizados para ventilação mecânica (Ventilador Harvard<sup>®</sup> para animais pequenos, modelo 683). Foi realizada esternotomia mediana, exposto o mediastino e o pericárdio foi retirado (Figura 4). Foram medidas as pressões ventriculares direitas e esquerdas, com um micromanómetro de alta-fidelidade, 2-Fr (SPR-324, Millar Instruments<sup>®</sup>), inserido nas cavidades ventriculares direitas e esquerdas, respectivamente. Os registos hemodinâmicos foram realizados com a respiração suspensa no fim da expiração. Os parâmetros foram convertidos para formato digital com uma frequência de amostragem de 1,000 Hz. As pressões máximas nos ventrículos direito (VD) e esquerdo (VE) foram medidas no fim da diástole e sístole. Foram quantificadas as velocidades máximas de aumento ( $dP/dT \text{ max}$ ) e de diminuição ( $dP/dT \text{ min}$ ) da pressão nos VD e VE. A velocidade de relaxamento foi avaliada pela constante de tempo  $\tau$ , adequando a queda de pressão a uma função monoexponencial.



**Figura 4 – Preparação experimental**

#### **ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

Uma vez terminada a análise hemodinâmica, a paragem cardíaca foi induzida pela injeção de KCl a 7,5%, intra-cardíaca. O coração e os pulmões foram dissecados e avaliado o seu peso. A parede livre do VD foi dissecada e pesada separadamente. Os pesos do coração, pulmões, VD e VE, foram normalizados para o peso corporal.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi feita usando o programa SPSS 12.0. Os dados são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão (SE) e foram comparados usando o teste *two way ANOVA*. Quando o teste de normalidade falhou, o teste ANOVA foi precedido por uma transformação logarítmica para obter uma distribuição normal. Quando os tratamentos foram significativamente diferentes, foi seleccionado o teste *Student-Newman-Keuls* para efectuar comparações múltiplas. O significado estatístico foi determinado para uma valor  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### MODELO INFANTIL DA MCT

Inicialmente foi usada a dose de 60 mg/Kg, no entanto, a mortalidade 21 dias após a administração de MCT, era de 100%. Estes animais apresentavam caquexia, ascite, derrame pleural e icterícia. Assim, foi necessário titular a dose de MCT (Tabela 5), pelo que foi titulada para a dose de 50 mg/Kg, que resultou igualmente em mortalidade de 100%. Usando a dose de 30 mg/Kg, obtiveram-se animais viáveis, aos 21 dias pós-MCT.

**Tabela 5 – Modelo infantil da MCT**

<b>Dose de MCT</b>	<b>Mortalidade</b>
60mg/Kg	100%
50mg/Kg	100%
30mg/Kg	80%

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA

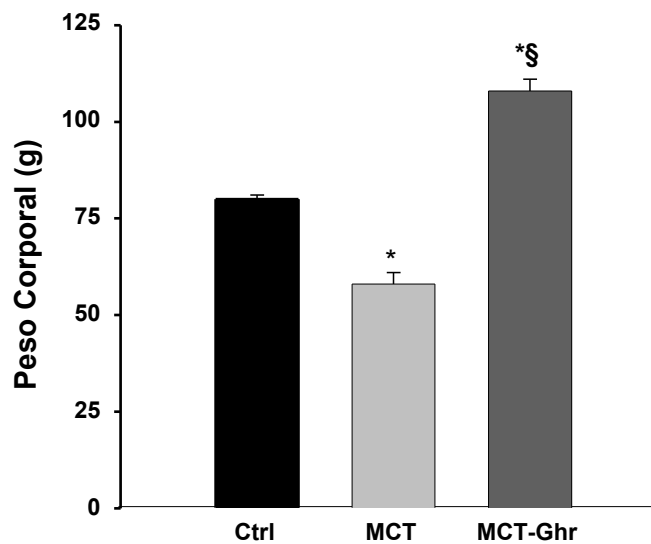
Os dados relativos ao crescimento somático, cardíaco e pulmonar encontram-se sumariados na tabela 6 e ilustrado nas figuras 5, 6 e 7. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o peso dos animais pertencentes aos vários grupos. Os animais do grupo MCT apresentavam um peso inferior aos do grupo controlo. O peso dos animais tratados com Ghr aumentou relativamente aos animais do grupo controlo. Em comparação com o grupo controlo, os pesos do coração e dos pulmões aumentaram significativamente no grupo MCT. O aumento do coração foi devido principalmente à contribuição do VD. No grupo tratado com

Ghr verificou-se uma diminuição dos pesos do VD e pulmões normalizados para o peso corporal.

**Tabela 6 – Dados morfométricos**

Dados	Unidades	Controlo	MCT	MCT-GHR
<b>Peso corporal (P)</b>	g	80±1	58±3*	108±3* <sup>§</sup>
<b>Peso pulmão/P</b>	g/Kg	8.20±0.33	11.534±0.82*	8.77±0.30 <sup>§</sup>
<b>Peso VD/P</b>	g/Kg	0.741±0.07	1.735±0.16*	1.414±0.12* <sup>§</sup>
<b>Peso VE/P</b>	g/Kg	3.27±0.45	4.36±0.26*	3.15±0.11 <sup>§</sup>

Dados em médias ± SE. VD, ventrículo direito; VE, ventrículo esquerdo; Ghr, grelina; MCT, monocrotalina. \* p < 0.05 vs controlo; § p < 0.05 vs MCT.



**Figura 5 – Efeitos da Ghr no crescimento somático**

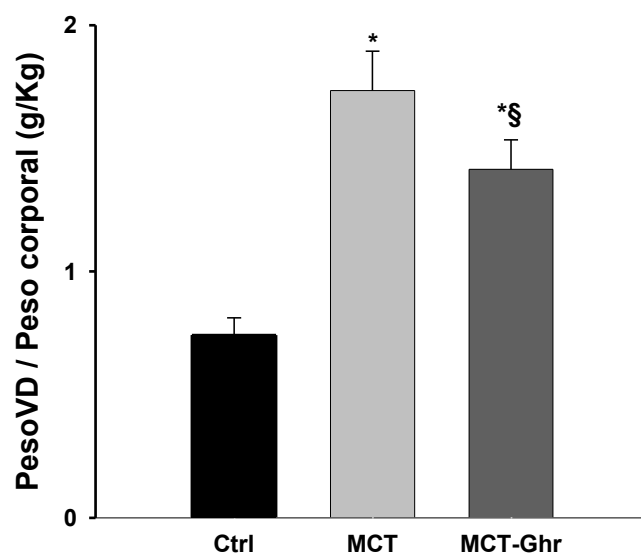


Figura 6 – Hipertrofia do VD induzida pela MCT e efeito do tratamento com Ghr sobre este parâmetro

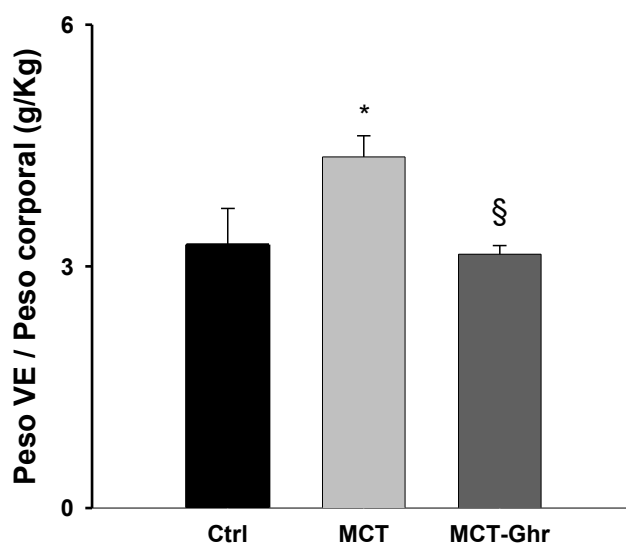


Figura 7 – Hipertrofia do VE induzida pela MCT e efeito do tratamento com Ghr sobre este parâmetro

## ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Os dados hemodinâmicos relativos ao VD encontram-se sumariados na tabela 7. A pressão sistólica máxima no VD ( $P_{VD_{max}}$ ), que avalia o grau de HTP, aumentou significativamente no grupo MCT. O tratamento com Ghr reduziu significativamente o grau de HTP (Figura 8). No grupo MCT também se verificou um aumento significativo do  $dP/dt_{max}$  VD, da constante de tempo  $\tau$  e das pressões telediastólicas. A Ghr reduziu os efeitos da MCT sobre a velocidade de relaxamento (constante de tempo  $\tau$ ) do VD, sobre a pressão telediastólica e sobre o  $dP/dt_{max}$ .

**Tabela 7 – Efeitos da Ghr nos parâmetros hemodinâmicos do VD**

Dados	Unidades	CONTROLO	MCT	MCT-GHR
<b>P VD<sub>max</sub></b>	mmHg	19.6±2.8	37.1±4.7*	22.6±3.2 <sup>§</sup>
<b>dP/dt<sub>max</sub> VD</b>	mmHg/s	663±74	1210±258*	908±187
<b>P VD<sub>telediastólica</sub></b>	mmHg	0.38±0.7	2.9±1.4*	1.81±0.43 <sup>§</sup>
<b>Tau (<math>\tau</math>)</b>	ms	13.2±0.8	28.3±4.3*	12.8±1.1 <sup>§</sup>

Dados em médias  $\pm$  SE. P VD<sub>max</sub>, pressão sistólica máxima no ventrículo direito;  $dP/dt_{max}$  VD, velocidade máxima de elevação da pressão; P VD<sub>telediastólica</sub>, pressão telediastólica no ventrículo direito;  $\tau$ , constante de tempo; GHR, grelina; MCT, monocrotalina. \*  $p < 0.05$  vs controlo; <sup>§</sup>  $p < 0.05$  vs MCT.

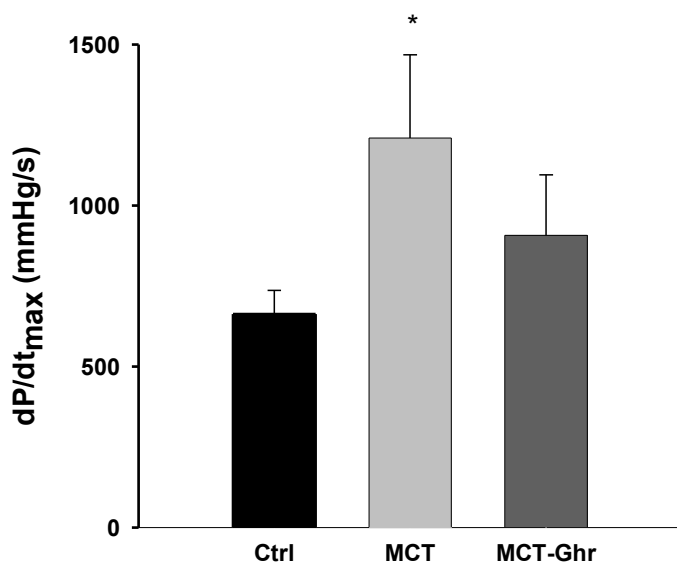
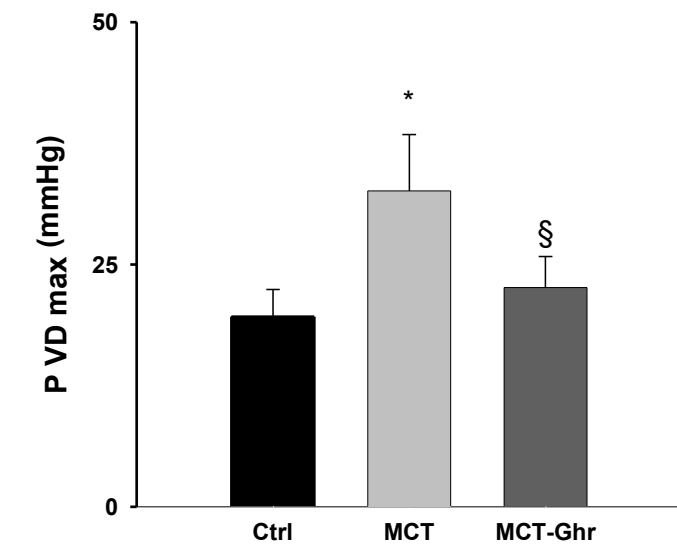


Figura 8 – Dados hemodinâmicos relativos à função sistólica do VD

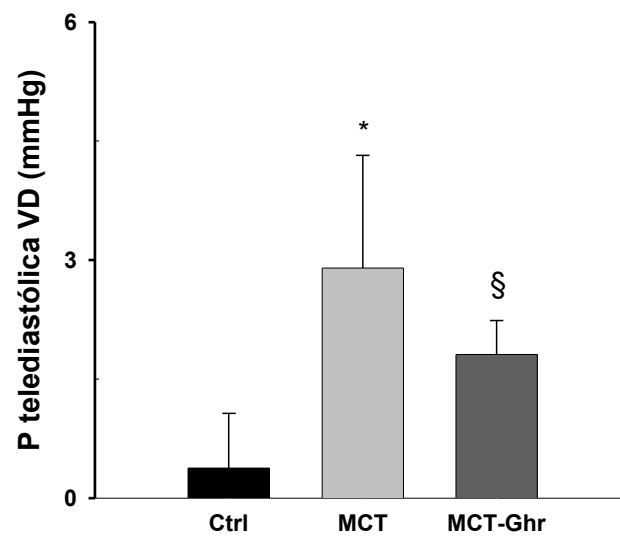
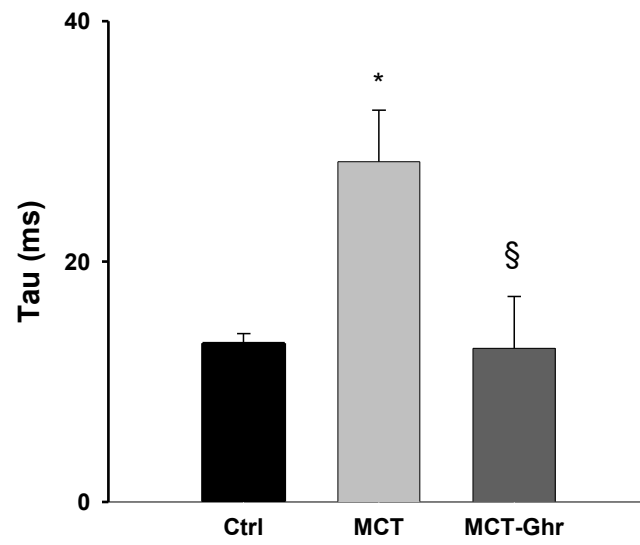


Figura 9 – Dados hemodinâmicos relativos à função diastólica do VD

Em relação ao VE (Tabela 9, figura 10), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dados hemodinâmicos dos diferentes grupos.

**Tabela 9 – Efeitos da Ghr nos parâmetros hemodinâmicos do VE**

Dados	Unidades	CONTROLO	MCT	MCT-GHR
<b>P VE<sub>max</sub></b>	mmHg	42,7±5,7	49,4±8,4	44,9±3,6
<b>PVE<sub>telediastólica</sub></b>	mmHg	2,6 ±0,5	2,9±1,4	3,0±1,12
<b>dP/dt<sub>max</sub> VE</b>	mmHg/s	1733±407	1747±573	1755,1±176
<b>dP/dt<sub>min</sub></b>	mmHg/s	-949± 202	-1073±360	-1040±129

Dados em médias ± SE. P VE<sub>max</sub>, pressão sistólica máxima no ventrículo esquerdo; dP/dt<sub>max</sub> VE, velocidade máxima de elevação da pressão; P VE<sub>telediastólica</sub>, pressão telediastólica no ventrículo esquerdo; GHR, grelina; MCT, monocrotalina.

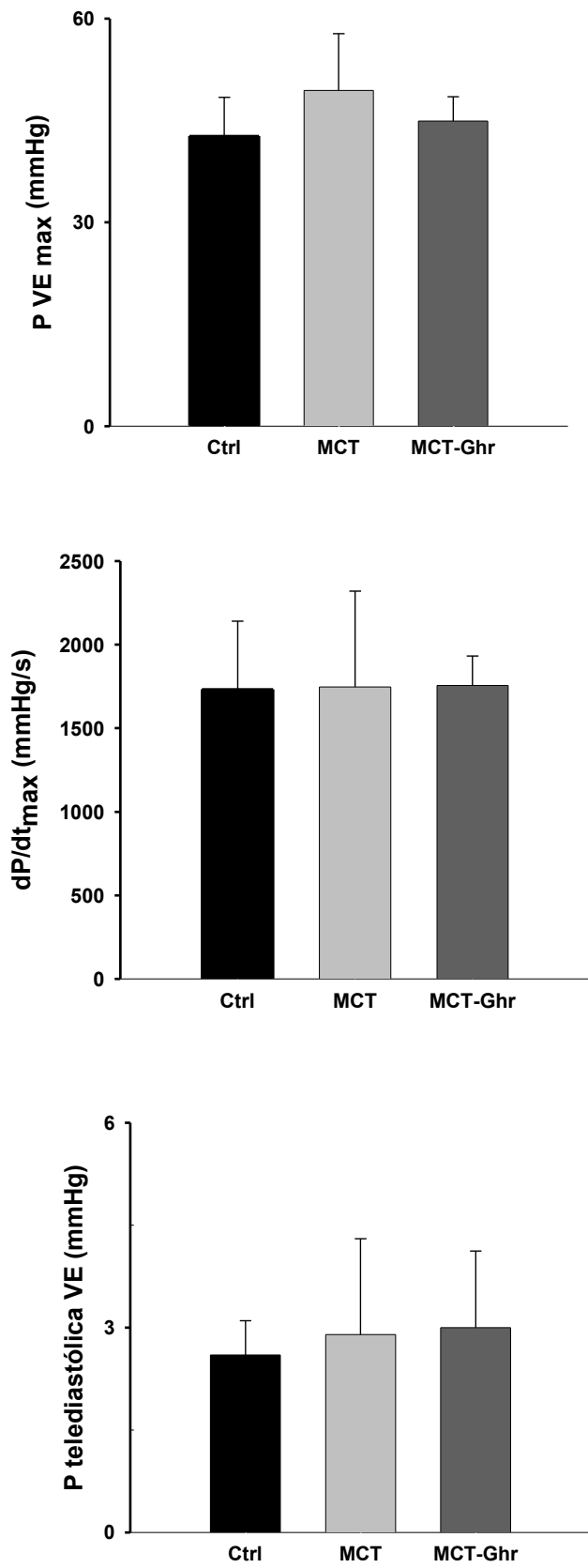


Figura 10 – Dados hemodinâmicos relativos ao VE

# DISCUSSÃO

## MODELO EXPERIMENTAL

O modelo de HTP induzida pela MCT é um dos mais utilizados na investigação da fisiopatologia da HTP do adulto bem como no estudo de novas abordagens terapêuticas. A MCT, após sofrer degradação hepática, origina um metabolito que provocará lesão aguda das células endoteliais do leito pulmonar e aumento transitório da permeabilidade vascular. Cerca de 10-14 dias após injeção, surge HTP e hipertrofia do VD, quando também são aparentes alterações inflamatórias difusas (Hill e Col. 1997). A MCT actua através de mecanismos como a vasculite pulmonar (Rabinovitch e Col. 1979; Hessel e Col. 2007), diminuição do metabolismo da 5-HT e diminuição da recaptação da noradrenalina nos pulmões, o que provoca vasoconstrição (Gillis e Col. 1978). Ratos com hipertrofia ventricular direita induzida pela MCT apresentam uma diminuição da densidade de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no VD (devido a diminuição da expressão e actividade do adrenoreceptor- $\beta_1$ ) e dessensibilização ao sistema adrenoreceptor- $\beta$ -proteína G-adenicícilase. Esta diminuição da resposta ao adrenoreceptor- $\beta$  pode explicar porque é que o VD hipertrofiado não consegue aumentar a contractilidade, que é necessária para manter a função cardíaca na HTP induzida pela MCT (Hessel e Col. 2006). Outros mecanismos envolvidos são o aumento da reactividade pulmonar (Rabinovitch e Col. 1979), a proliferação celular (mediadas pela ET-1), a obstrução mecânica por trombos plaquetários (Roth e Col. 1983; Hill e Col. 1997), a lesão endotelial directa e a degradação de proteínas do tecido conjuntivo da parede vascular (Todorovish-Hunter e Col. 1988). A degradação da matriz extra-celular pode condicionar diminuição da adesão do cardiomiócitos, o que poderia contribuir para a remodelagem ventricular direita causada pela MCT. As alterações estruturais no leito

vascular pulmonar incluem a muscularização das artérias distais, habitualmente não muscularizadas e a hipertrofia da média arterial pulmonar, que provocam aumento das resistências vasculares e da pressão arterial pulmonar (Rosemberg e Rabinovitch. 1988; Hessel e *Col.* 2007).

Rabinovitch e colaboradores descreveram um modelo de HTP induzido pela MCT em idades pediátricas (Rabinovitch e *Col.* 1985). Os ratos injectados no período neonatal (D3 de vida) não sobreviveram até às 3 semanas, provavelmente por troca inadequada de gases secundária à redução acentuada do número de alvéolos e artérias. A administração de MCT atingiu o período crítico para o desenvolvimento alveolar (D 3-8 de vida) e conseqüentemente a proliferação arterial (D8-11) provavelmente não ocorreu. Após 2 semanas, não havia hipertrofia significativa do VD e as alterações vasculares pulmonares eram semelhantes às observadas nos outros grupos, mas o desenvolvimento alveolar estava muito comprometido (< 1/3 do número normal). Os animais injectados no período infantil (D8 de vida) tinham desenvolvimento alveolar normal. Após duas semanas, as alterações arteriais (muscularização das artérias periféricas e hipertrofia da média) eram semelhantes às do adulto. Aparentemente, uma vez que se inicia a multiplicação alveolar, a MCT não interfere no desenvolvimento alveolar. Foi no grupo infantil que ocorreu aumento do tamanho das artérias pulmonares, uma característica que não foi afectada pela MCT. Isto sugere que o estímulo para o crescimento arterial pode ser independente da lesão endotelial e do aumento do músculo liso vascular que ocorre após injeção de MCT, tanto em pequenos como em grandes vasos. O que quer que estimule o crescimento, parece inibir a hipertrofia da média vascular adicional. Um estudo clínico suporta a teoria que associa o crescimento do leito vascular com a regressão das alterações estruturais. Nas

crianças com cardiopatia congénita e *shunt* esquerdo-direito, a correcção cirúrgica precoce está associada à regressão das alterações vasculares, resultantes do aumento de pressão e do fluxo na artéria pulmonar (Todd e Col. 1985; Rabinovitch e Col. 1984).

Durante o desenvolvimento deste modelo de HTP, foi determinante a titulação da dose de MCT adequada para induzir HTP. Este foi um processo moroso e exigente. Inicialmente foi utilizada a dose de 60mg/Kg, verificando-se que a mortalidade aos 21 dias, era de 100%, com desenvolvimento de caquexia acentuada, icterícia, ascite e derrame pleural. Seguidamente foi usada a dose de 50mg/Kg, que condicionou a mesma mortalidade e finalmente foi definida a dose de 30mg/Kg, com uma mortalidade aos 21 dias de cerca de 80%. Relativamente à avaliação morfométrica, verificámos que os animais a quem foi administrada MCT apresentaram um peso corporal inferior ao dos controlos, o que é sugestivo de atraso de crescimento, provavelmente secundário à insuficiência cardíaca. O aumento do peso dos pulmões poderá sugerir a presença de uma resposta proliferativa pulmonar e a hipertrofia acentuada do VD parede ser o resultado da sobrecarga de pressão induzida pela MCT. A hipertrofia miocárdica é um mecanismo compensatório pelo qual o tecido cardíaco se adapta ao aumento sustentado da pós-carga. Dependendo do grau ou da duração do aumento da pós-carga, a hipertrofia cardíaca pode progredir de um estado de compensação para um estado de disfunção sistólica ou diastólica e insuficiência cardíaca. O septo interventricular sofre rectilinizacão, apresenta um movimento paradoxal, o VD torna-se mais globoso e comprime o VE. A hipertrofia ventricular direita envolve hipertrofia dos cardiomiócitos (evidenciada por síntese proteica sem replicação celular), alterações na membrana dos cardiomiócitos e nas proteínas contrácteis, alteração

da homeostasia do cálcio, alterações na expressão genética e remodelagem da matriz extra-celular (Haworth 2007). Quando o coração desenvolve hipertrofia, e subsequentemente, insuficiência cardíaca, ocorrem alterações importantes a nível macroscópico e molecular. Esta remodelagem está associada a alterações características da expressão génica, tais como reactivação do programa de expressão génica fetal, provocando a expressão do factor natriurético auricular e do BNP e a troca das isoformas das cadeias pesadas da miosina  $\alpha$  para  $\beta$  e das isoformas de actina de  $\alpha$ -cardíacas para  $\alpha$ -esqueléticas. Adicionalmente, a expressão da ATPase do  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA2) está diminuída na insuficiência cardíaca terminal, no Homem e em modelos animais experimentais. Pelo contrário, a expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  está aumentada. Na HTP induzida pela MCT, apenas o VD está sujeito a sobrecarga de pressão, mas ambos os ventrículos estão expostos ao aumento da estimulação neuroendócrina. O miocárdio ventricular esquerdo dos ratos com HTP induzida pela MCT apresenta activação autócrina/parácrina, na ausência de stresse hemodinâmico nesse ventrículo e que, embora não ocorra hipertrofia miocárdica esquerda, o fenótipo contráctil está alterado (Lourenço e *Col.* 2006; Kogler e *Col.* 2003). No presente trabalho verificou-se um aumento do peso do VE, sugestivo de hipertrofia ventricular esquerda, o que poderá ser explicado pela imaturidade do miocárdio potencialmente associada a maior susceptibilidade às alterações neurohormonais às quais ambos os ventrículos estão expostos. No entanto, mais estudos serão necessários para testar esta hipótese.

## REPERCUSSÕES HEMODINÂMICAS

A pressão sistólica no VD e na artéria pulmonar podem ser estimadas por ecocardiograma-doppler, a partir da velocidade do fluxo de insuficiência tricúspide. A pressão sistólica na artéria pulmonar é igual à pressão sistólica no VD, na ausência de obstrução no trato de saída pulmonar. HTP ligeira pode ser definida como pressão sistólica na artéria pulmonar de 36-50 mmHg ou velocidade do fluxo de regurgitação tricúspide de 2,8-3,4 m/s (assumindo uma pressão normal na aurícula direita de 5 mmHg). Usando este método, é de esperar que surjam alguns falsos positivos e a confirmação do diagnóstico deverá ser feita por cateterismo cardíaco (Galiè e Col. 2004). O cateterismo cardíaco é necessário para estabelecer o diagnóstico definitivo de HTP, para determinar a gravidade da doença vascular pulmonar e o prognóstico. Durante este procedimento, são avaliadas as pressões na artéria pulmonar e a pressão de encravamento pulmonar, são determinados o tamanho do *shunt* e o fluxo pulmonar e as resistências vasculares pulmonares são calculadas dividindo o gradiente de pressão pelo fluxo sanguíneo através dos pulmões. O fluxo sanguíneo pode ser avaliado por termodiluição em doentes sem *shunt* ou pelo método de Fick com medição do consumo de oxigénio. Se o cateterismo cardíaco confirmar o diagnóstico de HTP com necessidade de terapêutica, deve ser realizada uma prova de vasodilatação pulmonar, que permite determinar a potencial vasorreatividade do leito pulmonar, com recurso a oxigénio ( $FiO_2=1$ ), NO inalado, adenosina intravenosa ou prostaciclina (Diller e Col. 2007; Beghetti e Col. 2006). Uma resposta significativa aos vasodilatadores pulmonares é definida como uma redução de pelo menos 20% da pressão arterial pulmonar média, sem alteração ou com aumento do débito cardíaco. Os doentes que respondem aos testes de vasodilatação pulmonar terão provavelmente uma resposta favorável com

o teste com bloqueador dos canais de cálcio e subsequentemente com tratamento oral com estes fármacos (Rosenzweig e *Col.* 2004). Uma percentagem significativamente maior de crianças com HTP idiopática (40%) responde à prova de vasodilatação pulmonar, em comparação com os adultos (20%) e quanto mais jovem é a criança, maior a probabilidade de vasodilatação na prova de vasorreatividade pulmonar. Usando a nova definição de resposta vasodilatadora (redução da pressão arterial média  $>10$  mmHg da linha basal para  $< 40$  mmHg na presença de débito cardíaco normal), a percentagem daqueles que respondem pode ser menor. Nas crianças com cardiopatia congénita, a determinação da vasorreatividade pulmonar permite discriminar entre aquelas com HTP fixa, irreversível, nas quais a correcção cirúrgica está associada a morbilidade e mortalidade significativas e aquelas com HTP reversível, que poderão beneficiar com a cirurgia correctiva (Beghetti e *Col.* 2006).

Neste trabalho, a pressão sistólica máxima no VD ( $PVD_{max}$ ), que avalia o grau de HTP, aumentou significativamente no grupo MCT. No grupo MCT também se verificou um aumento significativo do  $dP/dt_{max}$  VD, um índice de contractilidade miocárdica. No que diz respeito à função diastólica, ocorreu um aumento da constante de tempo  $\tau$  e das pressões telediastólicas, o que traduz disfunção diastólica. Um estudo recente demonstrou diminuição dos níveis de proteínas da SERCA no VD de ratos tratados com MCT, o que resultaria numa redução mais lenta do  $Ca^{2+}$  intracelular durante o relaxamento e explicaria o prolongamento do  $\tau$  (Kogler e *Col.* 2003). Na HTP, um aumento precoce no stresse sobre a parede durante a sístole é muito provavelmente seguido por um aumento no stresse na parede durante a diástole (Haworth 2007), o que está de acordo com os dados obtidos neste estudo.

## EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE GRELINA

A Ghr foi identificada por Kojima e colaboradores, em 1999 e desde então, tem sido implicada na modulação de numerosos processos fisiológicos, tais como a regulação do apetite, libertação da hormona de crescimento, modulação central do tónus simpático e controlo hemodinâmico directo (Nagaya e *Col.* 2006). Os níveis de Ghr no sangue e o seu ARNm no estômago, estão aumentados no jejum e diminuem durante a refeição. A hiperglicemia suprime os níveis circulantes de Ghr. Estes resultados confirmam que a Ghr funciona como um péptido estimulador do apetite. De facto, a administração de Ghr (periférica e intraventricular) estimula a ingestão de alimentos e aumenta o peso corporal tanto em ratos normais como em ratos com deficiência da HC. O núcleo arqueado do hipotálamo é o principal local de actuação da Ghr. A expressão hipotalâmica do neuropeptídeo Y (NPY) está aumentada nos ratos tratados com Ghr intraventricular. O efeito orexigénico da Ghr foi abolido de uma forma dependente da dose, pela co-injecção de um antagonista do receptor do neuropeptídeo Y (NPY/Y1). A Ghr é um estímulo à ingestão de alimentos, mediante a activação de neurónios do núcleo arqueado hipotalâmico, cujo mediador é o NPY. Curiosamente, a inibição da ingestão de alimentos induzida pela leptina, foi revertida pela co-injecção da Ghr de uma forma dependente da dose (Nagaya e Kangawa. 2003). Estes dados sugerem que a Ghr é um peptídeo orexigénico que antagoniza a leptina através da activação da via do receptor hipotalâmico NPY/Y1.

Tschop e colaboradores demonstraram que o tratamento com Ghr subcutânea durante 2 semanas provocava aumento de peso tanto em ratos normais como em ratos com deficiência da HC (Tschop e *Col.* 2000).

Os mecanismos através dos quais a Ghr induz aumento do apetite são:

- A Ghr circulante atinge e activa os corpos neuronais orexigénicos NPY/AGRP (*Agouti-related protein*) e/ou terminais no núcleo arqueado (ARQ), que por sua vez inibem as células anorexigénicas no ARQ.

- A Ghr é produzida localmente no hipotálamo, conectando e estimulando os neurónios orexigénicos NPY/AGRP no ARQ e neurónios orexina na área hipotalâmica lateral.

A caquexia cardíaca é caracterizada por anorexia, perda de massa magra e tecido adiposo associada com o aumento do consumo de energia, que caracteriza várias doenças crónicas, incluindo a insuficiência cardíaca e o cancro (Rocha-Sousa e *Col.* 2007). Em doentes com insuficiência cardíaca, a administração de Ghr pode melhorar a perda de massa muscular (Rocha-Sousa e *Col.* 2007). Estes efeitos poderão ser mediados, pelo menos em parte, pelo IGF-1/HC, que é essencial no músculo-esquelético. Os efeitos orexigénicos da Ghr são também fundamentais na regressão da caquexia cardíaca (Nagaya e *Col.* 2006).

Um resultado relevante obtido neste modelo pediátrico de HTP, foi o aumento do peso corporal, demonstrando-se que os animais tratados com Ghr tinham um peso superior ao dos controlos, o que pode ser atribuído não só à reversão da HTP e da hipertrofia ventricular direita, mas também aos efeitos orexigénicos da Ghr. Estes efeitos ocorrem pela activação de neurónios do núcleo arqueado do hipotálamo (Nakazato 2001). Estes resultados poderão vir a ter relevância clínica, uma vez que tendo o peso sido superior ao dos controlos, a obesidade deverá ser tida em conta como potencial efeito lateral da Ghr.

Os efeitos da Ghr têm sido atribuídos maioritariamente à libertação de HC por activação dos receptores GHSR na hipófise anterior. A administração de Ghr endovenosa aumentou de forma marcada a hormona de crescimento circulante em

ratos e em seres humanos, com maior potência que a GHRH (Nagaya e Kangawa. 2003). O nível máximo de hormona de crescimento ocorreu 15-20 minutos após uma injeção de Ghr, com manutenção dos níveis de Ghr por mais de 60 minutos. No entanto, os receptores GHSR também estão localizados no miocárdio e vasos (Katugampola e *Col.* 2001), sugerindo um potencial efeito vasodilatador da Ghr.

A Ghr melhorou a disfunção ventricular esquerda, atenuou o desenvolvimento da remodelagem vascular e a caquexia no modelo animal de insuficiência cardíaca (Nagaya e Kangawa. 2001; Henriques-Coelho e *Col.* 2004) e em seres humanos com insuficiência cardíaca terminal (Nagaya e *Col.* 2003). Outros mecanismos subjacentes à acção da Ghr são a melhoria da disfunção endotelial e o aumento da expressão endotelial da síntese do NO, através de um mecanismo independente da HC (Shimizu e *Col.* 2003).

O eixo HC/IGF-1 melhora a função miocárdica em condições normais e de insuficiência (Cittadini e *Col.* 1997; Duerr e *Col.* 1996; Yang e *Col.* 1995). A Ghr poderá ter efeitos benéficos na insuficiência cardíaca por estimulação deste eixo, actuando nos GHSR tipo 1a presentes no hipotálamo e na hipófise (Nagaya e *Col.* 2001) A estimulação do eixo HC/IGF-1 associa-se a melhoria da função sistólica do VE, que se relaciona, pelo menos em parte, com o aumento da expressão da SERCA2a (Tajima e *Col.* 1999). A administração de Ghr aumenta o débito cardíaco e reduz a pós-carga em corações normais e insuficientes (Nagaya e Kangawa. 2003). Aumenta a pressão de perfusão coronária e aumenta o fluxo vascular na microcirculação. No músculo cardíaco, a Ghr é um inotrópico negativo, promovendo libertação de prostaglandinas do endotélio endocárdico, um efeito independente do GHSR1a. A Ghr tem sido proposta como potencial alvo terapêutico do enfarte agudo

do miocárdio, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial e hipertensão pulmonar (Rocha-Sousa e *Col.* 2007).

O presente trabalho descreve, pela primeira vez, os efeitos da administração crónica de Ghr na HTP em idade pediátrica, tendo para o efeito, utilizado o modelo animal da MCT caracterizado no mesmo. Neste estudo, demonstrou-se que a administração de Ghr reduziu a hipertensão pulmonar e a hipertrofia ventricular. Estes efeitos poderão ser atribuídos a acções da Ghr, quer a nível pulmonar, quer a nível cardíaco. A nível pulmonar, a Ghr parece desempenhar um papel crucial no desenvolvimento fetal do pulmão (Volante e *Col.* 2002). No pulmão adulto existe uma importante expressão de ARNm de Ghr (Henriques-Coelho e *Col.* 2004; Gnanapavan e *Col.* 2002) e foram identificados locais de ligação dos secretagogos da hormona de crescimento a nível do parênquima e parede das artérias pulmonares (Papotti e *Col.* 2000; Katugampola e *Col.* 2001). Santos e colaboradores demonstraram que o pulmão fetal é um dos primeiros a expressar Ghr durante o desenvolvimento e pode ser considerada uma nova fonte de Ghr circulante fetal (Santos M e *Col.* 2006).

No grupo tratado com grelina verificou-se uma diminuição do peso dos pulmões normalizado para o peso corporal. Considerando estas evidências em conjunto com os dados obtidos neste trabalho, parece lícito propor que a Ghr poderá desempenhar um papel na fisiopatologia da HTP. A diminuição significativa da hipertrofia ventricular direita poderá ser explicada pelo efeito indirecto da diminuição da magnitude da HTP, isto é, da pós-carga à qual o VD foi submetido. A Ghr também tem um efeito inotrópico negativo e efeitos lusitrópicos (Soares e *Col.* 2006), que poderão contribuir para a diminuir o desenvolvimento de hipertrofia VD.

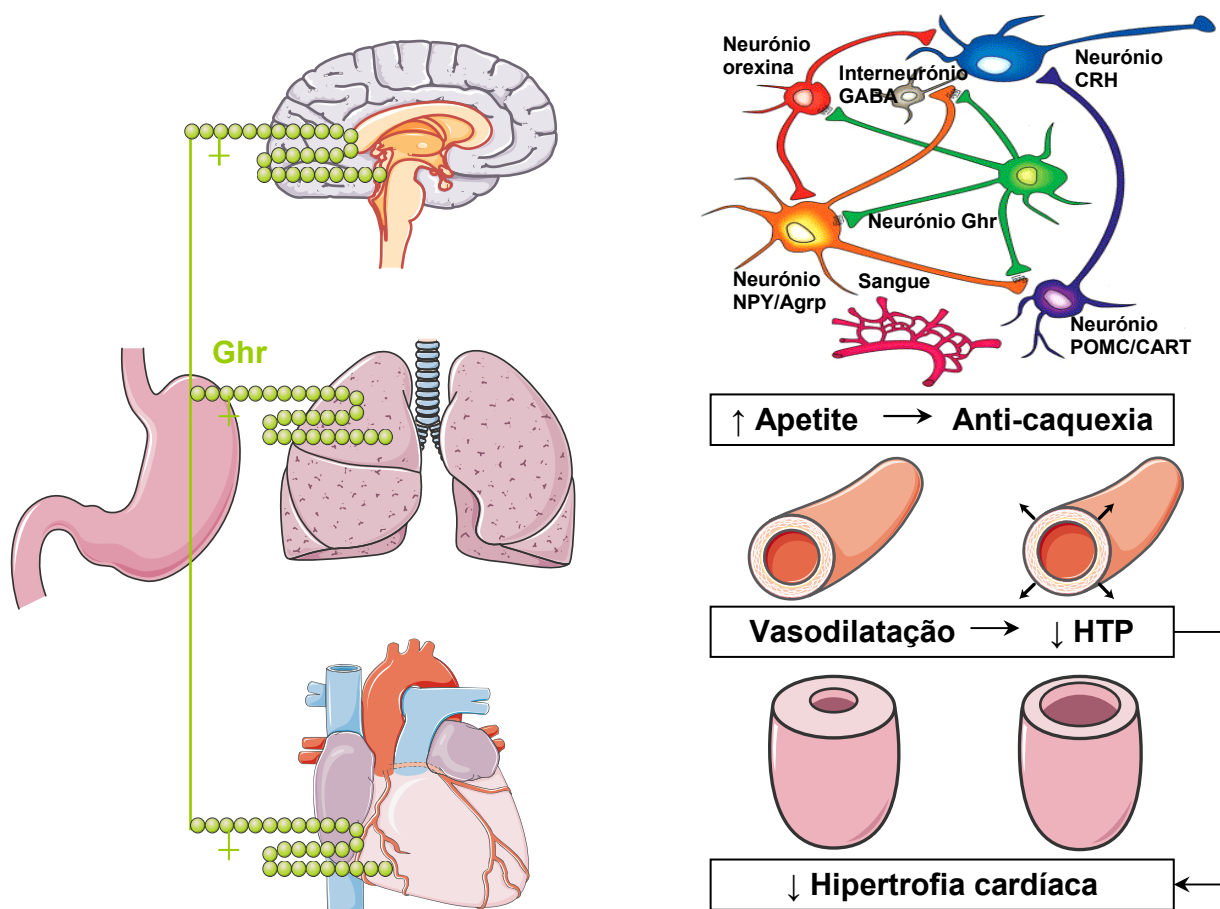
Os mecanismos envolvidos poderão incluir a vasodilatação pulmonar, a remodelagem vascular e a melhoria da disfunção endotelial. Como a MCT induz uma disfunção endotelial marcada (Meyrick e *Col.* 1980; Werchan e *Col.* 1989), os benefícios da Ghr observados neste estudo poderão ser atribuídos a uma melhoria da função do endotélio pulmonar. O NO é um vasodilatador potente e um inibidor da remodelagem ventricular, logo a Ghr poderia indirectamente aumentar a biodisponibilidade do NO, embora mais estudos sejam necessários para o confirmar. Por outro lado, a via Ghr-GHSR reverte a vasoconstrição induzida pela ET-1 por mecanismos independentes do eixo HC/IGF-1 e do endotélio (Nagaya e *Col.* 2001; Wiley e Davenport. 2002). A ET-1 encontra-se aumentada na HTP e parece estar implicada na HTP induzida pela MCT (Frasch e *Col.* 1999; Lourenço e *Col.* 2006).

A nível cardíaco, a Ghr melhorou a função hemodinâmica e os parâmetros morfométricos do VD. Estes efeitos podem ser atribuídos à redução da pós-carga do VD bem como a acções miocárdicas da Ghr. Uma redução da pós-carga sobre o VD irá favorecer primariamente uma recuperação da função e estrutura do VD. Os efeitos miocárdicos da Ghr poderão ser mediados pelos GHSR ou pelo eixo HC/IGF1. A primeira hipótese é apoiada pela expressão preservada dos GHSR em animais tratados com MCT (Henriques-Coelho e *Col.* 2004). No grupo MCT ocorreu uma marcada diminuição na velocidade de relaxamento (aumento do  $\tau$ ), efeitos que foram significativamente revertidos pela Ghr, ou seja, a Ghr melhorou a disfunção diastólica do VD.

## CONCLUSÕES

Em conclusão, este trabalho permitiu caracterizar o modelo animal de HTP induzida pela MCT em idade pediátrica, quer a nível morfológico quer a nível hemodinâmico, o que permitirá uma melhor compreensão da fisiopatologia da HTP.

A administração crónica de grelina constituiu uma abordagem eficaz na redução da progressão da HTP num modelo pediátrico de HTP induzido pela MCT. Podemos concluir (Figura 11) que a Ghr melhora a HTP, reduzindo a hipertrofia ventricular direita, enquanto que a nível central tem efeitos orexigénicos, que contribuem para a melhoria da caquexia associada à HTP. Estes resultados são altamente promissores, sugerindo que a Ghr deverá continuar a ser investigada como um potencial alvo terapêutico para a HTP que constitui uma patologia para a qual se dispõe de relativamente poucas opções terapêuticas eficazes, que permitam uma melhoria da sobrevivência e da qualidade de vida das crianças com HTP.



**Figura 11 – Efeitos benéficos da Ghr na HTP. Efeitos a nível cardíaco a vascular e suas interações. Conexões da Ghr no hipotálamo (Cowley e *Col.* 2003; Korbonits e *Col.* 2004). A Ghr estimula o receptor GHS pré-sináptico localizado nos axónios dos neurónios NYP que conectando às células proopiomelanocortina (POMC) no ARC e estimulam a libertação do neurotransmissor inibitório GABA, inibindo os neurónios anorexigénicos POMC. O efeito da Ghr no núcleo paraventricular nas células CRH é mais complexo. Os receptores GHS-R estimulam a libertação de NYP, que inibem a libertação de GABA, resultando na desinibição dos neurónios CRH conduzindo à libertação de ACTH e cortisol. As células de Ghr também podem conectar aos neurónios orexigenicos no hipotálamo lateral e estimula a sua actividade.**

## BIBLIOGRAFIA

Allen K, Haworth SG. Human postnatal pulmonary arterial remodeling. Ultrastructural studies of smooth muscle cell and connective tissue maturation. *Lab Invest* 1988; 59: 702-709.

Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, Morrell NW. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 2002; 105 (14): 1672-1678.

Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonissoni S, Fubini A, Malan D, Baj G, Granata R, Broglio F, Papotti M, Surico N, Bussolino F, Isgaard J, Deghenghi R, Sinigaglia F, Prat M, Muccioli G, Ghigo E and Graziani A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 2002; 159: 1029-37.

Baptista MJ, Recamán M, Melo-Rocha G, Nogueira-Silva C, Roriz JM, Soares-Fernandes J, Gonzaga S, Santos M, Leite-Moreira A, Areias JC, Correia-Pinto J. Myocardium expression of connexin 43, SERCA2a and myosin heavy chain isoforms are preserved in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia rat model. *Journal of Pediatric Surgery* 2006; 41: 1532-1538.

Baptista MJ, Rocha G, Clemente F, Azevedo LF, Tibboel D, Leite-Moreira AF, Guimarães H, Areias JC, Correia-Pinto J. N-Terminal-pro-B Type Natriuretic Peptide as a Useful Tool to Evaluate Pulmonary Hypertension and Cardiac Function in CDH Infants. *Neonatology* 2008; 94: 22-30.

Basu S, Datta BN, Khandelwal N. Morphologic changes in pulmonary vasculature with arteriographic correlation. *Angiology* 1996; 47: 375-380.

Beghetti M, Barst R, Naeije R, Rubin L. Pulmonary Arterial Hypertension Related to Congenital Heart Disease, Urban & Fischer, 2006.

Boxt LM, Katz J, Kolb T, Czegledy FP, Barst RJ. Direct quantitation of right and left ventricular volumes with nuclear magnetic resonance imaging in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:1508-1515.

Campbell AI, Zhao Y, Sandhu R, Stewart DJ. Cell-based gene transfer of VEGF attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 2242-8.

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

Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992 Jul 9; 327(2): 70-5.

Cittadini A, Grossman JD, Napoli R, Katz SE, Stromer H, Smith RJ, Clark R, Morgan JP, Douglas PS. Growth hormone attenuates early ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with large myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 29:1109-1116, 1997.

Colvin J, Bower C, Dickinson JE, Sokol J. Outcomes of congenital diaphragmatic hernia: a population-based study in Western Australia. *Pediatrics*. 2005 Sep;116(3):e356-63.

Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nilni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a

novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 20;37(4): 649-61.

D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 1991; 115:343-349.

Davie NJ, Crossno JT Jr, Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, Hyde DM, Carpenter TC, Brunetti JA, McNiece IK, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 286(4): L668-78.

Dakshinamurti S. Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Pulmonol*. 2005 Jun;39(6):492-503. Review.

Dees E and Baldwin S. New frontiers in molecular pediatric cardiology. *Curr Opin in Pediatr* 2002, 14(5): 627-633.

Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000; 67(3): 737-44.

Diller GP, Gatzoulis MA. Pulmonary vascular disease in adults with congenital heart disease. *Circulation* 2007; 115(8): 1039-1050.

Du L, Sullivan CC, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Yuan JX, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003; 348: 500-509.

Duerr RL, McKirnan MD, Gim RD, Clark RG, Chien KR, Ross J Jr. Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation* 1996; 93: 2188-2196.

Eysmann SB, Palevsky HI, Reichel N, Hackney K, Douglas PS. Two-dimensional and Doppler-echocardiographic and cardiac catheterization correlates of survival in primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1989 Aug; 80(2): 353-60.

Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1999; 276: L304-L310.

Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;18(4). Review.

Galiè N, Torbicki RB, Dartevielle P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin L, Simonneau G. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. *European Heart Journal* 2004; 25, 2243-2278.

Giad A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333: 214-21.

Gillis CN, Huxtable RJ, Roth RA. Effects of monocrotaline pretreatment of rats on removal of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline by perfused lung. *Br J Pharmacol*. 1978 Jul; 63(3): 435-43.

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2988-2991.

Haworth SG. Primary pulmonary hypertension in childhood. *Arch Dis Child*. 1998; 79; 452-455.

Haworth SG. Cell and molecular biology of RV dysfunction in pulmonary hypertension. *European Heart Journal Supplements*. 2007, 9 (supplement H), H10-H16.

Henriques-Coelho T, Castro-Chaves P, Roncon-Albuquerque R Jr, Soares JB, Lourenco AP, Leite-Moreira AF. Myocardial effects of ghrelin and expression of its receptors in progression to right ventricular failure. *Eur Heart J* 27 (Abstract Suppl.): 423, 2003.

Henriques-Coelho T, Castro-Chaves P, Roncon-Albuquerque R Jr, Soares JB, Lourenco AP, Leite-Moreira AF. Myocardial effects of ghrelin and expression of its receptors in progression to right ventricular failure. *Circulation* 108 (Supplement IV.):276, 2003.

Hessel HM, Steendijk P, Adel B, Schutte C, Laarse A. Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Heart Physiol* 2006; 291: H2424-H2430.

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):13S-24S. Review.

Hill NS, Warburton RR, Pietras L, Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol*. 1997;83(4):1209- 15.

Hoehn T. Therapy of pulmonary hypertension in neonates and infants. *Pharmacology and therapeutics* 2007; 114; 318-326.

Humpl T, Reyes JT, Holtby H, Stephens D, Adatia I. Beneficial effect of oral sildenafil therapy on childhood pulmonary hypertension: twelve-month clinical trial of single-drug, open-label, pilot study. *Circulation* 2005; 111(24), 3274-3280.

Iglesias MJ, Pineiro R, Blanco M, Gallego R, Dieguez C, Gualillo O, Gonzalez-Juanatey JR, Lago F. Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2004; 62: 481-8.

Ito KM, 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(4):H1786-95.

Jeffery TK, Upton PD, Trembath RC, Morrell NW. BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad1 and JNK pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Feb;288(2):L370-8.

Katugampola S, Pallikaros Z, Davenport AP. [125I-His9]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue; up regulation of receptors with atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 134: 143-149, 2001.

Kiserud T. Physiology of the fetal circulation. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2005; Dec;10(6):493-503. Review.

Kiserud T, Acharya G. The fetal circulation. *Prenat Diagn.* 2004 Dec 30;24(13):1049-59. Review.

Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, Nguyen VP, Schott P, Broddle OE, Hasenfuss G. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res* 2003; 93: 230-237.

Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin – a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2004; 25: 27-68.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.

Lamberts RR, Vaessen RJ, Westerhof N, Stienen GJM. Right ventricular hypertrophy causes impairment of left ventricular diastolic function in the rat. *Basic Research in Cardiology* 2007; Volume 102, Number 1.

Lakshminrusimha S, Steinhorn RH. Pulmonary vascular biology during neonatal transition. *Clin Perinatol* 1999; 26: 601-619.

Leite-Moreira AF and Soares JB. Physiological, pathological and potential therapeutic roles of ghrelin. *Drug discovery today* 2007; 12 (7-8): 276-288.

Leite-Moreira AF, Rocha-Sousa A, Henriques-Coelho T. Cardiac, skeletal, and smooth muscle regulation by ghrelin. *Vitam Horm* 2008; 77: 207-38.

Lourenço AP, Roncon-Albuquerque R, Brás-Silva C, Faria B, Wieland J, Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Leite-Moreira A. Myocardial dysfunction and neurohumoral activation without remodeling in left ventricular of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 2006; 291: 1587-1594.

Lorch SA, Cnaan A, Barnhart K. Cost-Effectiveness of Inhaled Nitric Oxide for the Management of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *Pediatrics*. 2004; 114(2): 417-426.

Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Lane KB, Morgan NV, Wheeler L, Phillips JA 3rd, Newman J, Williams D, Galiè N, Manes A, McNeil K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Corris P, Humbert M, Donnai D, Martensson G, Tranebjaerg L, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet*. 2001; 68(1): 92-102.

McLaughlin VV, Gaine SP, Barst RJ, Oudiz RJ, Bourge RC, Frost A, Robbins IM, Tapson VF, McGoon MD, Badesch DB, Sigman J, Roscigno R, Blackburn SD,

Arneson C, Rubin LJ, Rich S; Treprostinil Study Group. Efficacy and safety of treprostinil: an epoprostenol analog for primary pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003 Feb; 41(2):293-9.

McLeod KA, Gerlis LM, Williams GJ. Morphology of the elastic pulmonary arteries in pulmonary hypertension: a quantitative study. *Cardiology in the Young* 1999; 9: 364-370.

Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980; 239:H692-H702.

Mohseni-Bod H, Bohn D. Pulmonary hypertension in congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg*. 2007 May;16(2):126-33.

Morrell NW, Yang X, Upton PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, Trembath RC. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation*. 2001 Aug 14; 104(7): 790-5.

Nagaya N, Kojima M, Kanagawa K. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary-associated cachexia. *Intern Med* 2006; 45: 127-134.

Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3:146-151.

Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. Chronic administration of grelina improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 104:1430-1435, 2001.

Nicholas SH, Warburton RR, Pietras L, Klinger J. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1997 ; 83: 1209-1215.

Nishihara A, Watabe T, Imamura T, Miyazono K. Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell*. 2002 Sep; 13(9): 3055-63

Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 15;277(7):5330-8.

Papotti M, Ghe C, Cassoni P, Catapano F, Deghenghi R, Ghigo E, Muccioli G. Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3803-3807.

Puri A, McGoon M and Kushwaha Sudhir S. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2007; 4, 319-329.

Rabinovitch M, Kean JF, Norwood WI, Castaneda AR, Reid LM. Vascular structure in lung tissue obtained at biopsy correlated with pulmonary hemodynamic findings after repair of congenital heart defects. *Circulation* 1984; 69: 655-667.

Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol*. 1979; 236(6): H818-27.

Rabinovitch M. Pulmonary hypertension: pathophysiology as a basis for clinical decision making. *J Heart Lung Transplant*. 1999 Nov; 18(11): 1041-53.

Raymond RJ, Hinderliter AL, Willis PW, Ralph D, Caldwell EJ, Williams W, Ettinger NA, Hill NS, Summer WR, de Boisblanc B, Schwartz T, Koch G, Clayton LM,

Jöbsis MM, Crow JW, Long W. Echocardiographic predictors of adverse outcomes in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Apr 3; 39(7): 1214-9.

Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1988; 255:H1484-91.

Rocha-Sousa A, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira A. Potential role of the growth hormone secretagogues in clinical practice. *Expert Opin. Ther. Patents*, 2007;17(8), 909-925.

Rosenzweig EB, Widlitz AC, Barst RJ. Pulmonary arterial hypertension in children. *Pediatr Pulmonol*. 2004;38(1):2-22.

Rosenzweig EB, Ivy DD, Widlitz A, Doran A, Claussen LR, Yung D, Abman SH, Morganti A, Nguyen N, Barst RJ. Effects of long-term bosentan in children with pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(4): 697-704.

Roth, RA. Lung vascular injury from MCT pyrrole, a putative hepatic metabolite. *Adv Exp Med Biol*. 1991; 283: 477-487.

Rudarakanchana N, Flanagan JA, Chen H, et al. Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1517-1525.

Santos M, Bastos P, Gonzaga S, Roriz JM, Baptista MJ, Nogueira-Silva C, Melo-Rocha G, Henriques-Coelho T, Roncon-Albuquerque R Jr, Leite-Moreira AF, De Krijger RR, Tibboel D, Rottier R, Correia-Pinto J. Ghrelin expression in human and rat fetal lungs and the effect of ghrelin administration in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Res*. 2006 Apr; 59 (4 Pt 1): 531-7.

Schermuly RT, Schulz A, Ghofrani HA, Breitenbach CS, Weissmann N, Hildebrand M, Kurz J, Grimminger F, Seeger W. Comparison of pharmacokinetics

and vasodilatory effect of nebulized and infused iloprost in experimental pulmonary hypertension: rapid tolerance development. *J Aerosol Med.* 2006 Fall; 19(3):353-63.

Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169(1): 39-45.

Schulze-Neick I, Hartenstein P, Li J, Stiller B, Nagdyman N, Hübner M, Butrous G, Petros A, Lange P, Redington AN. Intravenous sildenafil is a potent pulmonary vasodilator in children with congenital heart disease. *Circulation.* 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II167-73

Shimizu Y, Nagaya N, Teranishi Y, Imazu M, Yamamoto H, Shokawa T, Kangawa K, Kohno N, Yoshizumi M. Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:830-835.

Shinde UA, Desai KM, Yu C, Gopalakrishnan V. Nitric oxide synthase inhibition exaggerates the hypotensive response to ghrelin: role of calcium-activated potassium channels. *J Hypertens.* 2005; 23: 713-5.

Simonneau G, Galiè N, Rubin LJ, Langleben D, Seeger W, Domenighetti G, Gibbs S, Lebrec D, Speich R, Beghetti M, Rich S, Fishman A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jun 16; 43(12 Suppl S):5S-12S. Review.

Soares JB, Rocha-Sousa A, Castro-Chaves P, Henriques-Coelho T, Leite-Moreira AF. Inotropic and lusitropic effects of ghrelin and their modulation by the endocardial endothelium, NO, prostaglandins, GHS-R1a and K<sub>Ca</sub> channels. *Peptides.* 2006 Jul;27(7):1616-23.

Tatebe S. Induction of right ventricular hypertrophy in neonatal guinea pigs by monocrotaline. *Japanese Circulation Journal* 1996; 60: 604-607.

Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* 2001 Feb; 15(2): 427-38.

Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study. *Lab Invest.* 1988;58(2):184-95.

Todd, L. Mullen M, Olley P, Rabinovitch M. Pulmonary toxicity of monocrotaline differs at critical periods of lung development. *Pediatric Research* 1985; 19 (7): 731-737.

Tschop M, Smiley ML, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 2000; 407: 908-913.

Tuder RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159(6):1925-32.

Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Cool CD, Bishop AE, Geraci M, Semenza GL, Yacoub M, Polak JM, Voelkel NF. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol.* 2001 Oct; 195(3): 367-74.

Tulloh R. Management and therapeutic options in pediatric pulmonary hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4(3): 361-374.

Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1013-1021.

Wanstall JC, Gambino A, Jeffery TK, Cahill MM, Bellomo D, Hayward NK, Kay GF. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res.* 2002; 55(2): 361-8.

Werchan PM, Summer WR, Gerdes AM, McDonough KH. Right ventricular performance after monocrotalina-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1989; 256:H1328-H1336.

Weir EK, Reeve HL, Huang JM, Michelakis E, Nelson DP, Hampl V, Archer SL. Anorexic agents aminorex, fenfluramine, and dexfenfluramine inhibit potassium current in rat pulmonary vascular smooth muscle and cause pulmonary vasoconstriction. *Circulation.* 1996; 94(9): 2216-20.

Widlitz A, Barst RJ. Pulmonary arterial hypertension in children. *Eur Respir J* 2003; 21: 155-176.

Wiley KE, Davenport AP. Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: grelina is a potent physiological antagonist of endothelin-1. *Br J Pharmacol* 2002; 136:1146-1152.

Yang X, Long L, Southwood M, Rudarakanchana N, Upton PD, Jeffery TK, Atkinson C, Chen H, Trembath RC, Morrell NW. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2005 May 27; 96(10):1053-63.

Yang R, Bunting S, Gillett N, Clark R, Jin H. Growth hormone improves cardiac performance in experimental heart failure. *Circulation* 1995; 92:262-267.

Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, Orens JB, Rubin LJ. Dysfunctional voltage-gated K<sup>+</sup> channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1998 Oct 6;98(14):1400-6.

Yu PB, Beppu H, Kawai N, Li E, Bloch KD. Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005; 280(26): 24443-50.

Zhao YD, Campbell AI, Robb M, Ng D, Stewart DJ. Protective role of angiotensin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2003; 92(9): 984-91.

Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ, Yuan JX. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 2003; 285(3): L740-54.