

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Matheus Mittmann Hennemann

**EFEITOS DO BETA-BLOQUEADOR BUCINDOLOL SOBRE MOLÉCULAS  
VASOATIVAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DO TECIDO PULMONAR EM  
MODELO DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Porto Alegre

2016

Matheus Mittmann Hennemann

**EFEITOS DO BETA-BLOQUEADOR BUCINDOLOL SOBRE MOLÉCULAS  
VASOATIVAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DO TECIDO PULMONAR EM  
MODELO DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de habilitação: Fisiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriane Belló-Klein

Coorientadora: Ma. Bruna Gazzi de Lima Seolin

Porto Alegre

2016

### **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

Hennemann, Matheus Mittmann

Efeitos do beta-bloqueador bucindolol sobre moléculas vasoativas e enzimas antioxidantes do tecido pulmonar em modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina / Matheus Mittmann Hennemann. -- 2016.

68 f.

Orientadora: Adriane Belló-Klein.

Coorientadora: Bruna Gazzi de Lima Seolin.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. hipertensão arterial pulmonar. 2. bucindolol. 3. endotelina. 4. óxido nítrico . 5. estresse oxidativo. I. Belló-Klein, Adriane, orient. II. Lima Seolin, Bruna Gazzi de, coorient. III. Título

Matheus Mittmann Hennemann

**EFEITOS DO BETA-BLOQUEADOR BUCINDOLOL SOBRE MOLÉCULAS  
VASOATIVAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES DO TECIDO PULMONAR EM  
MODELO DE HIPERTENSÃO PULMONAR INDUZIDA POR MONOCROTALINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Cavalheiro Schenkel- UFRGS

---

Dr. Rafael Oliveira Fernandes - UFRGS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriane Belló-Klein - UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Roberto e Eliana, pelo apoio incondicional, confiança e dedicação em tudo que fizeram e fazem em relação a mim e pela compreensão de sempre.

Aos amigos do Núcleo, que desde sempre são meus companheiros nos melhores e piores momentos. Laura, Luísa, Carolina, Juliane, Michelle, Vitor, Murilo e Nicolas: sou muito grato pela felicidade e diversão que vocês me proporcionam!

Aos amigos da Biomedicina, pela companhia e parceria na convivência desses anos na universidade. Agradeço ao Natã pela amizade e por seu olhar crítico acerca de tudo, o que me fez crescer muito. À Micaela, sou grato pelo companheirismo e pelo exemplo que me passa em encarar tudo com muita felicidade e um belo sorriso no rosto.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS, pelo acolhimento, pela disposição de sempre em ajudar, pelos momentos compartilhados, pelos ensinamentos e pelas risadas. Agradeço especialmente aos amigos Alexandre, Luiza, Rayane, Jéssica e Rafael. Não teria conseguido sem a ajuda de vocês.

Agradeço à Alessandra Godoy e ao Isnard Litvin pelo apoio técnico e ajuda na interpretação dos resultados.

À minha coorientadora Bruna, pela paciência e parceria a todo o momento. Sua dedicação e disposição são um exemplo pra mim! Quero um dia aprender a encarar a vida de forma tão leve, porém comprometida, como você encara suas responsabilidades.

À Professora Adriane, que me acolheu de braços abertos no laboratório, confiando sempre no meu potencial e minha capacidade. Muito obrigado pelos seus ensinamentos, comentários sempre pertinentes e simpatia que a faz ser a grande pessoa que és.

Por fim, agradeço o auxílio financeiro do órgão CNPq.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR .....	8
1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR.....	10
<b>1.2.1 Definição</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.2 Epidemiologia</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2.3 Fisiopatologia</b> .....	<b>11</b>
1.3 MOLÉCULAS VASOATIVAS .....	14
<b>1.3.1 Endotelina</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3.2 Óxido nítrico</b> .....	<b>16</b>
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
1.5 HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA NA HIPERTENSÃO PULMONAR.....	21
1.6 BLOQUEADORES ADRENÉRGICOS .....	22
1.7 BUCINDOLOL .....	24
<b>1.7.1 Bucindolol e HAP</b> .....	<b>24</b>
1.8 MODELO EXPERIMENTAL DE HAP .....	25
<b>2 Justificativa</b> .....	<b>28</b>
<b>3 Objetivos</b> .....	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 Artigo científico</b> .....	<b>30</b>
1 RESUMO.....	31
2 INTRODUÇÃO.....	32
3 MÉTODOS .....	33
<b>3.1 Aprovação ética</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 Desenho experimental</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3 Preparação dos tecidos</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4 Determinação da concentração proteica</b> .....	<b>35</b>
<b>3.5 Atividade enzimática</b> .....	<b>35</b>
<b>3.6 Lipoperoxidação</b> .....	<b>35</b>
<b>3.7 Análise da expressão proteica por <i>Western Blot</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.8 Histologia</b> .....	<b>36</b>

<b>3.9 Análise estatística</b> .....	<b>36</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1 Enzimas antioxidantes</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 Lipoperoxidação</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3 Expressão de receptores da ET-1 e da enzima eNOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4 Parâmetros histológicos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5 Correlações</b> .....	<b>43</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>47</b>
<b>5 Conclusões e perspectivas</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA VASCULAR PHARMACOLOGY</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 HIPERTENSÃO PULMONAR

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença crônica, de rápida evolução e mau prognóstico (Hoeper e Granton, 2011), caracterizada por uma pressão média da artéria pulmonar (mPAP)  $\geq 25$  mmHg durante cateterismo cardíaco em repouso (Hoeper *et al.*, 2013). Trata-se de uma doença que pode ocorrer de forma isolada ou associada a outras condições, como a doenças do coração esquerdo e as doenças pulmonares obstrutivas crônicas (Moreira *et al.*, 2014).

A classificação mais atual da HP, apresentada em 2013, no V Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, a divide em cinco grupos (Tabela 1) que compartilham semelhanças nos mecanismos fisiológicos e abordagens terapêuticas (Simonneau *et al.*, 2013).



Tabela 1. Classificação da hipertensão pulmonar, apresentada no V Simpósio Mundial de Hipertensão Pulmonar, em Nice, na França. Retirado e adaptado de Simonneau *et al.*, 2013.

---

### Classificação atualizada da Hipertensão Pulmonar

---

1. Hipertensão arterial pulmonar (HAP)
    - 1.1. HAP idiopática
    - 1.2. HAP hereditária
      - 1.2.1. BMPR2
      - 1.2.2. ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
    - 1.3. HAP induzida por drogas e toxinas
    - 1.4. HAP associada com:
      - 1.4.1. Doenças do tecido conjuntivo
      - 1.4.2. Infecção por HIV
      - 1.4.3. Hipertensão portal
      - 1.4.4. Doença cardíaca congênita
      - 1.4.5. Esquistossomose
  - 1'. Doença pulmonar veno-oclusiva e hemangiomatose capilar pulmonar
  - 1". Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido
  2. Hipertensão pulmonar causada por doenças do coração esquerdo
    - 2.1. Disfunção sistólica
    - 2.2. Disfunção diastólica
    - 2.3. Doença valvar
    - 2.4. Outras doenças congênitas que levam à disfunção cardíaca primária
  3. Hipertensão pulmonar causada por doença pulmonar e/ou hipóxia
    - 3.1. Doença pulmonar obstrutiva crônica
    - 3.2. Doença intersticial pulmonar
    - 3.3. Outras doenças de padrão misto (restritivo e obstrutivo)
    - 3.4. Desordens respiratórias do sono
    - 3.5. Doenças que cursam com hipoventilação alveolar
    - 3.6. Exposição crônica a grandes altitudes
    - 3.7. Doenças do desenvolvimento pulmonar
  4. Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica
  5. Hipertensão pulmonar com mecanismos multifatoriais ou não esclarecidos
    - 5.1. Alterações hematológicas: anemias, crônicas hemolíticas, doenças mieloproliferativas, esplenectomia
    - 5.2. Doenças sistêmicas: sarcoidose, histiocitose pulmonar, linfangioleiomiomatose
    - 5.3. Distúrbios metabólicos: tireoidopatias, doenças de depósito
    - 5.4. Outros: embolização tumoral, mediastinite fibrosante, insuficiência renal crônica e hipertensão pulmonar segmentar
- 

BMPR2 = receptor do tipo 2 da proteína morfogênica óssea; ALK-1 = receptor-*like* de activina cinase-1; ENG = endoglin; SMAD9; CAV1 = caveolina-1; HIV = vírus da imunodeficiência humana.

## 1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR

### 1.2.1 Definição

A hipertensão arterial pulmonar (HAP), uma das classificações da HP, apresenta-se como uma doença de remodelamento vascular que gera aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) (Malenfant *et al.*, 2013). A etiologia precisa permanece desconhecida, todavia o dano inicial à vasculatura pulmonar, que ocorre de forma idiopática ou associado a doenças ou exposições a drogas, é um dos gatilhos iniciais as alterações encontradas (Chin e Rubin, 2008). A HAP pode ser sub-classificada em: HAP idiopática, HAP hereditária, HAP induzida por drogas e toxinas e HAP associada a doenças. Devido aos sintomas iniciais serem inespecíficos, o diagnóstico da HAP comumente é realizado já em fases avançadas. A apresentação clínica desta doença se dá principalmente por dispnéia, fadiga, fraqueza, intolerância ao esforço, angina, pré-síncope, síncope e edema de extremidades (Chin e Rubin, 2008; Crosswhite e Sun, 2010). Assim, o diagnóstico geralmente é estabelecido quando já existe comprometimento do ventrículo direito (VD), levando à insuficiência cardíaca direita e morte prematura (Malenfant *et al.*, 2013). Os efeitos patológicos gerados no VD, resultante de doenças que acometam a estrutura ou função pulmonar, caracterizam o quadro denominado *cor pulmonale* (Shujaat *et al.*, 2007).

A ecocardiografia é usualmente o primeiro exame que indica possibilidade de HAP, e o uso associado a técnicas de Doppler podem auxiliar nessa suspeita. Além disso, o eletrocardiograma também pode ser útil na suspeita de HAP ao indicar desvio de eixo ou hipertrofia de VD. Contudo, o diagnóstico preciso e a determinação da severidade da doença só são alcançados após o exame invasivo de cateterismo cardíaco direito (Chin e Rubin, 2008).

### 1.2.2 Epidemiologia

A HAP é uma doença rara e estima-se que sua incidência mundial ocorra em torno de 10 a 52 casos por milhão de habitantes (Peacock *et al.*, 2007; Kiely *et al.*, 2013), com maior incidência na sexta década de vida, sendo a predominância do sexo feminino bastante variável (Hoepfer e Gibbs, 2014). Uma revisão mais recente (Hoepfer *et al.*, 2016) estima que 100 mil adultos sejam afetados pela HAP, números que não incluem aquelas associadas à esquistossomose e à infecção por HIV, importantes em certas regiões do mundo, como no Brasil e no continente africano (Graham *et al.*, 2010). Em território nacional, a HAP associada à esquistossomose é uma das formas mais prevalentes da doença, juntamente com a idiopática

(Lapa *et al.*, 2009). O mesmo estudo demonstrou que 8% dos pacientes com esquistossomose apresentaram HAP, caracterizando a infecção por *S. mansoni* um importante fator de desenvolvimento da doença, possivelmente devido ao estímulo inflamatório causado pelo parasita (Graham *et al.*, 2010).

Em estudos, a alteração hemodinâmica cardíaca direita, o sexo masculino, a RVP alta e a limitação de exercício foram descritos como fatores intimamente ligados ao aumento da mortalidade em pacientes com HAP (Benza *et al.*, 2010; Humbert *et al.*, 2010). O estado funcional do coração é um importante fator prognóstico da doença, sendo mais relevante que os níveis de pressão arterial pulmonar (Tuder *et al.*, 2013). Em geral, a sobrevivência média dos pacientes é de aproximadamente 10 anos com o tratamento, em comparação a uma sobrevivência de 2,8 anos quando não tratados (Mcgoon *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2014).

### **1.2.3 Fisiopatologia**

Devido aos mecanismos que envolvem vasoconstrição e remodelamento de pequenas artérias e arteríolas pulmonares, com subsequente aumento do tônus vascular e RVP, a HAP é descrita como uma irregularidade circulatória (McLaughlin *et al.*, 2015). Seu mecanismo patogênico não é conhecido pelo fato da doença ser multifatorial (Simonneau *et al.*, 2013). Acredita-se, porém, que uma inflamação inicial na vasculatura pulmonar leve ao desbalanço entre as moléculas vasoconstritoras – como a endotelina-1 – e as vasodilatadoras – como o óxido nítrico (NO). Esse desbalanço promove aumento da espessura da túnica média, remodelamento da túnica adventícia e formação da neoíntima (Figura 1). O envolvimento de células inflamatórias, macrófagos e linfócitos, também já foi descrito como característico da HAP, principalmente na forma idiopática (Cool *et al.*, 1999; Humbert *et al.*, 2004). O infiltrado inflamatório é encontrado na região perivascular e junto ao tecido conjuntivo dos vasos (Tuder e Voelkel, 1998).

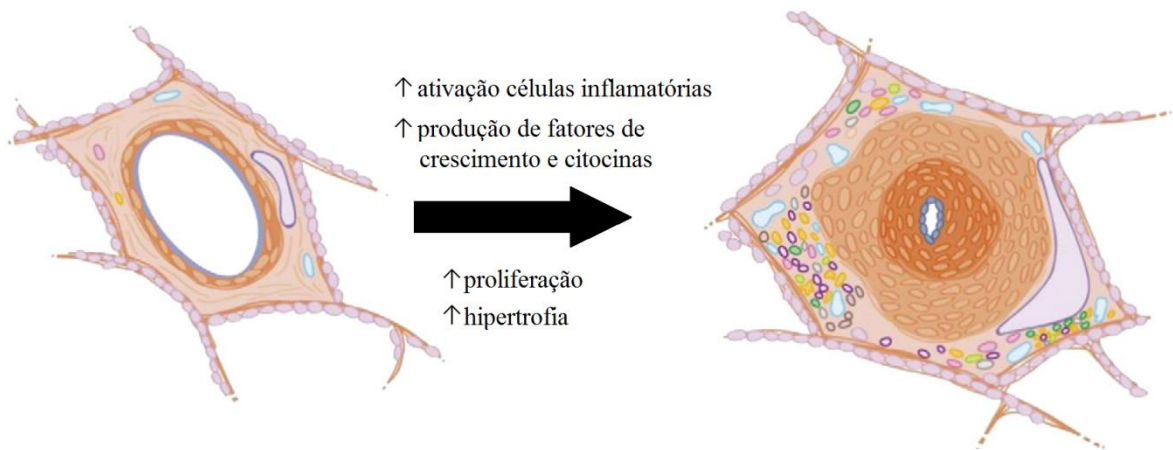


Figura 1. Esquema representando os fatores que influenciam no remodelamento vascular na hipertensão arterial pulmonar. Retirado e adaptado de (Montani *et al.*, 2014)

Em decorrência da vasoconstrição e do aumento da RVP, há aumento da pós-carga do VD. Para que ocorra a redução do estresse de parede e manutenção da função sistólica, segundo a Lei de Laplace (Figura 2), por via compensatória, o VD sofre hipertrofia (Bogaard *et al.*, 2009).

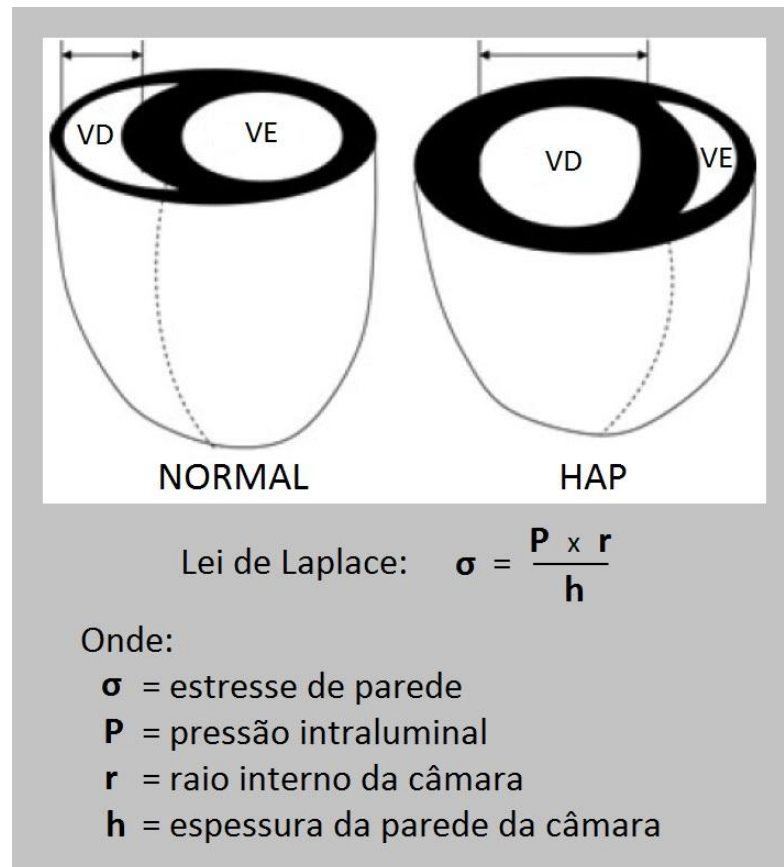


Figura 2. Estrutura do ventrículo direito em situação normal, à esquerda, e na HAP, à direita. VD = ventrículo direito; VE = ventrículo esquerdo; HAP = hipertensão arterial pulmonar. Retirado e adaptado de Bogaard *et al.*, 2009.

A câmara não é capaz, contudo, de sustentar essa sobrecarga de pressão a longo prazo. Visto isso, há diminuição da força de contração por modificações estruturais e funcionais nos cardiomiócitos, e o VD dilata (Gerges *et al.*, 2015). Uma vez que o VD tem sua fração de ejeção diminuída por não conseguir vencer a pressão pulmonar aumentada, ocorre uma hipertrofia mal-adaptativa que leva, através de diversos mecanismos, à insuficiência cardíaca direita. Os mecanismos que levam da hipertrofia ventricular direita à dilatação da câmara não estão bem descritos, todavia, acredita-se que a ativação neuro-hormonal, o estresse oxidativo e a apoptose estejam envolvidos (Bogaard *et al.*, 2009). Visto isso, o entendimento do envolvimento de moléculas vasoativas se torna importante uma vez que a vasculatura pulmonar está intimamente associada ao desenvolvimento da doença.

### 1.3 MOLÉCULAS VASOATIVAS

Agentes vasoativos são importantes para o controle e regulação do tônus, da reatividade e da estrutura vascular. Entre essas moléculas estão a endotelina (ET) e o óxido nítrico (NO) (Callera *et al.*, 2007; Baliga *et al.*, 2013), cujas ações na disfunção endotelial, remodelamento e inflamação vascular já foram descritos estarem envolvidos na patogênese de diversas doenças, incluindo a HAP (Callera *et al.*, 2007).

#### 1.3.1 Endotelina

As endotelinas constituem uma família de peptídeos que se apresentam em 3 isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). A ET-1, com 21 aminoácidos, é a isoforma predominante em mamíferos e difere de ET-2 e ET-3 por 2 e 6 aminoácidos, respectivamente (Shao *et al.*, 2011; Miyagawa e Emoto, 2014). As endotelinas são secretadas como pré-pró-endotelina, e sua conversão em ET é feita por enzimas conversoras de endotelina, localizadas na membrana plasmática de células endoteliais e de músculo liso pulmonares (Shivakumar e Kartha, 1992). Entre as células que secretam ET estão células epiteliais, macrófagos, fibroblastos, cardiomiócitos, neurônios e células endoteliais, com destaque para as últimas. No tecido pulmonar, a produção pelas células endoteliais ocorre devido a um estímulo em resposta ao aumento de pressão vascular, ou estresse de cisalhamento (Callera *et al.*, 2007). A síntese é estimulada por noradrenalina (NA), insulina e hipóxia e inibida por NO, peptídeo natriurético atrial e prostaciclina (Kedzierski e Yanagisawa, 2001).

A ET-1 apresenta como função principal a vasoconstrição na circulação sistêmica e pulmonar, uma vez que é reconhecida como um dos principais moduladores da homeostase vascular. Um estudo, em ratos que receberam injeção de ET-1 radioativa, foi observada distribuição majoritária do peptídeo no tecido pulmonar (Fukuroda *et al.*, 1994). Além disso, a ET-1 estimula a produção de fatores de crescimento (Pedram *et al.*, 1997) e apresenta atividade mitogênica em células de músculo liso vascular (Zamora *et al.*, 1993).

Os receptores A (ET-A) e B (ET-B) da endotelina são do tipo associados à proteína G e distinguem entre si quanto as suas localizações e aos segundos mensageiros ativados (Miyagawa e Emoto, 2014). O ET-A é encontrado nas células do músculo liso vascular e é seletivo para ET-1 e ET-2. Por outro lado, o ET-B é encontrado tanto em células do músculo liso vascular quanto em células endoteliais e liga todas isoformas de ET (Galié *et al.*, 2004). Quando as ET ligam nos receptores do endotélio, a resposta é a produção de NO e

prostaciclina, e quando ligam nos receptores de células do músculo liso medeiam vasoconstrição e proliferação celular, além de estimular inflamação local (Zamora *et al.*, 1993; Baliga *et al.*, 2013). Sun e colaboradores (2014) demonstraram que, após a ligação de ET-1 em ET-A, há indução de fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e consequente translocação dessa enzima da membrana plasmática para a mitocôndria, diminuindo a biodisponibilidade de NO. Apesar dessa ação dúbia na vasculatura, a ação predominante da ET-1 é a vasoconstritora.

A meia-vida da ET-1 plasmática é curta – menos de um minuto –, e sua ação fisiológica é dita autócrina ou parácrina. A regulação dos níveis de ET-1 é feita, principalmente, pela circulação pulmonar (mais de 50%) (Callera *et al.*, 2007; Baliga *et al.*, 2013; Miyagawa e Emoto, 2014). Ratos que foram administrados com um antagonista seletivo de ET-B apresentam diminuição de 95% na ligação de ET-1 no tecido pulmonar, indicando a importância desse receptor no *clearance* da endotelina (Fukuroda *et al.*, 1994).

Devido à sua ação vasoconstritora, a ET-1 tem sido estudada em doenças cardiovasculares (Kedzierski e Yanagisawa, 2001). Os níveis plasmáticos de ET-1 em indivíduos saudáveis não são detectados devido à baixa quantidade e ao *clearance* pulmonar. Todavia, em pacientes hipertensos, inclusive com HAP, esses níveis estão elevados, sendo até correlacionados à severidade da doença (Baliga *et al.*, 2013; Miyagawa e Emoto, 2014). Ademais, níveis elevados de ET-A e reduzidos de ET-B são descritos na HAP, tanto em modelos animais quanto em pacientes (Davie *et al.*, 2002; Miyagawa *et al.*, 2014). Além disso, a medida da razão dos receptores ET-A/ET-B aumentada é encontrada na HAP e está associada à proliferação da musculatura lisa e ao remodelamento vascular (Kuc *et al.*, 2014). Sendo assim, o efeito vasoconstritor da ET, juntamente com a diminuição do *clearance* pelo ET-B, contribuem para o desenvolvimento e agravamento da HP (Kedzierski e Yanagisawa, 2001; Miyagawa e Emoto, 2014).

Estudos clínicos demonstraram correlação entre os níveis séricos de ET-1 com aumento de RVP em pacientes com HAP (Callera *et al.*, 2007). Animais *knock-out* para ET-1 demonstraram, em estudo de HAP, pressão arterial diminuída, indicando o importante papel desse peptídeo na manutenção do tônus vascular (Miyagawa e Emoto, 2014).

Atualmente, há alguns antagonistas de receptores de endotelina-1 disponíveis na clínica para o tratamento da HAP. Apesar dos efeitos benéficos, como melhora na capacidade em exercício, frequência cardíaca (FC) e parâmetros ecocardiográficos, o uso desses antagonistas demonstraram também toxicidade hepática e retenção de líquidos em grande

parte dos pacientes. Devido a isso e ao fato de que o aumento de ET-1 pode ser tanto causa como consequência da doença, novas abordagens medicamentosas são sugeridas para o tratamento da hipertensão arterial pulmonar (Galiè *et al.*, 2016).

### 1.3.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, altamente lipofílico e considerado um radical livre (Crosswhite e Sun, 2010). Sua síntese ocorre nas células do endotélio vascular, na presença de oxigênio molecular e a partir da oxidação de L-arginina (Stuehr, 1999). Essa reação é catalisada pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), das quais três isoformas são conhecidas: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida (iNOS). As duas primeiras são produzidas constitutivamente por células endoteliais e neuronais, respectivamente, sendo estimuladas por aumento nos níveis de  $Ca^{2+}$ . A iNOS, por outro lado, é produzida por macrófagos pulmonares em resposta a citocinas inflamatórias e não é regulada pelos níveis de  $Ca^{2+}$ . Enquanto a iNOS e nNOS são solúveis e encontradas principalmente no citosol, a eNOS, por sua vez, está associada à membrana plasmática (Pacher *et al.*, 2007; Crosswhite e Sun, 2010). Além de produzir NO sob condições basais, as eNOS têm sua produção incrementada pelo estresse de cisalhamento produzido pelo fluxo sanguíneo sob as células endoteliais vasculares (Cerqueira e Yoshida, 2002). Recentemente, outras fontes endógenas de NO têm sido descritas, como nitritos ( $NO_2^-$ ) e nitratos ( $NO_3^-$ ), indicando que esses podem ser precursores de NO em situações patológicas em que a atividade das NOS estão prejudicadas (Lundberg *et al.*, 2008). A sinalização do NO é autócrina e parácrina, uma vez que sua meia-vida e gradiente de difusão são limitados por reações de conversão em nitrato, através de hemoglobina e mioglobina, e interação com outros radicais, como o ânion superóxido (Pacher *et al.*, 2007; Lundberg *et al.*, 2008).

O óxido nítrico liberado no lúmen do vaso é um importante regulador da homeostase vascular. Além de ser um potente vasodilatador (Lundberg *et al.*, 2008), é um importante inibidor da agregação e adesão plaquetária na parede vascular, atua igualmente na inibição de leucócitos no endotélio, além de inibir a proliferação das células da musculatura lisa vascular e a resposta inflamatória (Delbin *et al.*, 2009; Crosswhite e Sun, 2010). Ao se ligar em receptores no músculo liso, o NO estimula a produção do segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Esse leva à defosforilação da cadeia leve da miosina. A dissociação da ligação miosina-actina leva ao relaxamento muscular e à dilatação do vaso (Crosswhite e Sun, 2010), tornando o NO, então, um dos responsáveis pela regulação da



pressão sanguínea (Cerqueira e Yoshida, 2002). Devido aos seus efeitos, o estudo do NO está frequentemente associado ao da ET-1, visto que essas moléculas vasoativas apresentam ações opostas.

Apesar de apresentar ações fisiológicas que atuam na homeostase dos vasos, o NO também está associado a inúmeras doenças cardiovasculares. Na HAP, o desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores está associado à redução da disponibilidade de NO, visto que este é o principal vasodilatador pulmonar (Crosswhite e Sun, 2010). Sistemas onde ocorre aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), demonstraram, também, diminuição nos níveis de NO (Cerqueira e Yoshida, 2002). Isso se deve ao fato de que o NO se combina com o  $O_2^{\cdot-}$  de forma rápida sem a necessidade de enzimas para catalisar a reação (Figura 3). O produto dessa combinação é o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um poderoso oxidante altamente instável (Pacher *et al.*, 2007; Delbin *et al.*, 2009). Em situações fisiológicas, a formação de  $ONOO^-$  é muito baixa, devido aos mecanismos de eliminação de NO e  $O_2^{\cdot-}$  serem eficientes. Contudo, em certas doenças, os mecanismos de defesa não são suficientes para conter os níveis desses substratos, de forma que um aumento de 10 vezes em suas concentrações acarreta um aumento de 100 vezes na concentração de peroxinitrito (Pacher *et al.*, 2007).

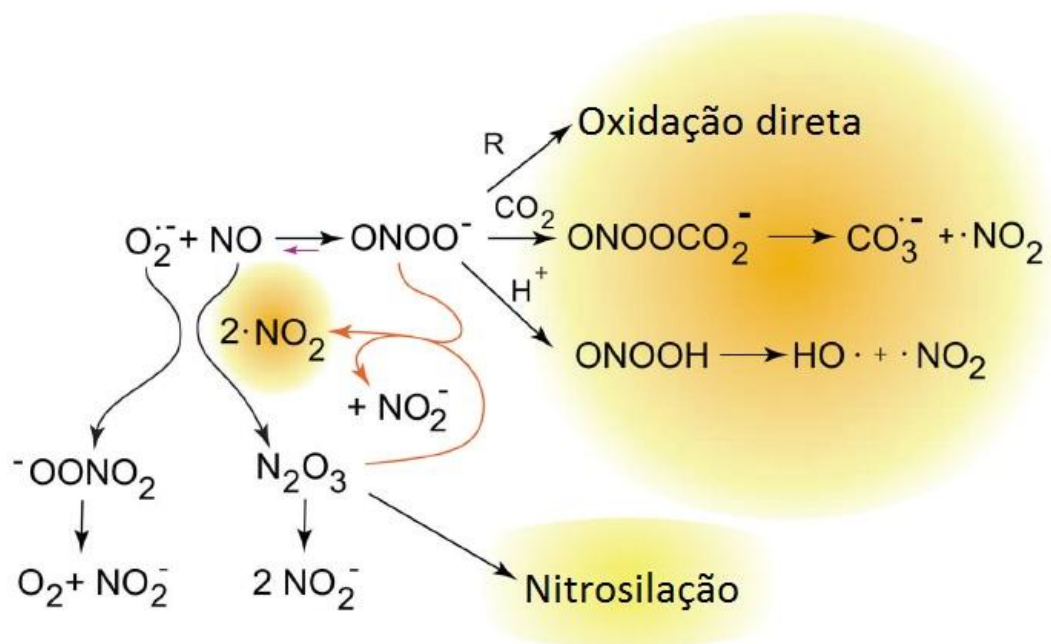


Figura 3. Interação entre ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e seus efeitos deletérios através dos mecanismos destacados em fundo amarelado. Retirado e adaptado de Pacher *et al.*, 2007.

A estabilidade do peroxinitrito é maior em comparação a moléculas parecidas, e sugere-se que essa característica seja importante para seu papel patogênico, uma vez que ele difunde por mais tempo pelos tecidos até alcançar alvos com que apresenta maior afinidade. Entre esses alvos estão proteínas, que sofrem nitrosilação (Figura 3), e lipídeos, que sofrem peroxidação (Kyaw *et al.*, 2004). Além desses efeitos deletérios, o peroxinitrito também é capaz de oxidar ácidos nucléicos e ativar o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), fatores de crescimento e citocinas, levando a danos celulares por meio do remodelamento vascular e estimulação do processo inflamatório (Delbin *et al.*, 2009).

O NO, portanto, está diretamente associado ao  $O_2^{\bullet-}$ , importante oxidante em sistemas biológicos. Dessa forma, o estresse oxidativo deve ser estudado juntamente com o metabolismo do óxido nítrico.

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio é uma molécula essencial para o funcionamento do organismo, mas também é tóxico (Gerschman *et al.*, 1954) devido a sua capacidade de formar radicais livres (RL). Os RL são produtos do metabolismo normal, derivados tanto de fontes endógenas (mitocôndrias, peroxissomos, retículo endoplasmático) quanto exógenas (poluição, fumaça, metais pesados, drogas, radiação) (Phaniendra *et al.*, 2015). Por definição, radical livre é todo aquele átomo ou molécula que apresenta um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência. Isso o torna instável e reativo, além de possuir meia-vida curta (Kyaw *et al.*, 2004; Phaniendra *et al.*, 2015). Devido a essa reatividade, os RL podem reagir rapidamente com outros compostos, levando à oxidação ou redução dos mesmos, o que acaba por desestabilizá-los de modo a interferir em suas características primárias (Phaniendra *et al.*, 2015).

Além dos radicais livres, outras moléculas também apresentam alta reatividade. O termo espécies reativas engloba tanto essas moléculas reativas não radicalares quanto os radicais livres (Kyaw *et al.*, 2004; Dinh *et al.*, 2014). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) também são geradas por fontes endógenas ou exógenas (Phaniendra *et al.*, 2015) e apresentam papel tanto fisiológico como patológico. Quando em concentrações baixas, ERO e ERN estão envolvidos fisiologicamente na defesa do organismo pelo sistema imune, em vias de sinalização celular, respostas mitogênicas e regulação redox do organismo. Contudo, em altas concentrações, as espécies reativas geram estresse oxidativo e nitrosativo, causando dano a biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA (Phaniendra *et al.*, 2015; Siti *et al.*, 2015).

Estresse oxidativo é o estado de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros, que leva a efeitos nocivos no organismo (Sies, 1997; Dinh *et al.*, 2014). Entre os oxidantes, estão as ERO, como ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e as ERN, como peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) e óxido nítrico (NO). Entre as fontes dessas espécies estão as enzimas xantina oxidase, oxigenases, peroxidases, NOS, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase entre outras (Figura 4) (Kyaw *et al.*, 2004; Siti *et al.*, 2015).

Os sistemas de defesa antioxidantes são capazes de se adaptar a alterações nos níveis de oxidantes a fim de manter o balanço oxidantes/antioxidantes (estado redox). As reservas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas. As reservas enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona

redutase (GR). Entre as reservas não-enzimáticas, destaca-se a glutatona reduzida (GSH) (Delbin *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2015).

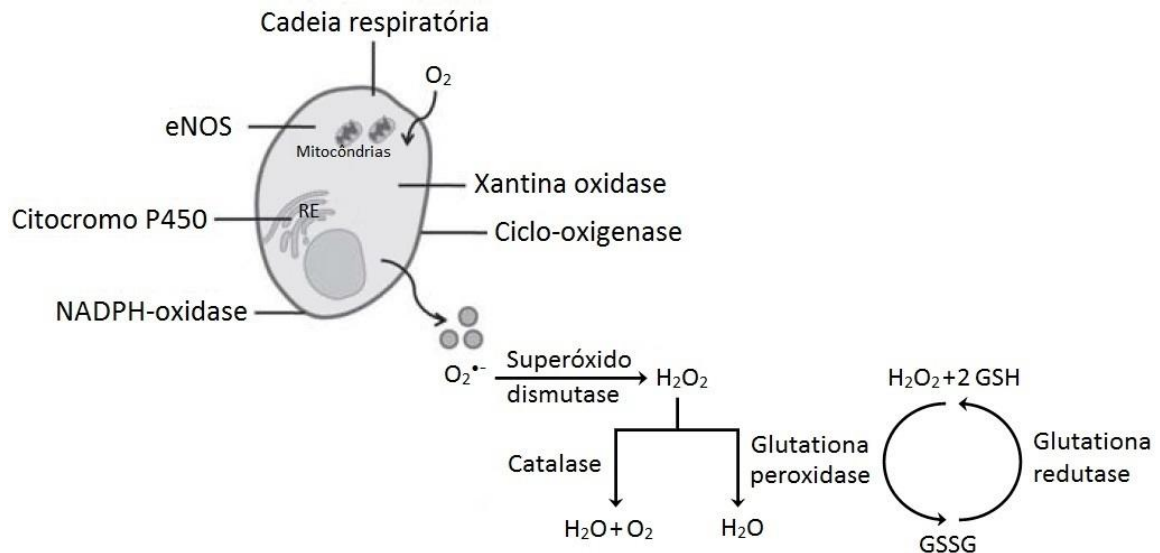


Figura 4. Sistema de enzimas pró e antioxidantes. eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; RE = retículo endoplasmático; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato; O<sub>2</sub><sup>•-</sup> = ânion superóxido; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio; H<sub>2</sub>O = água; O<sub>2</sub> = oxigênio molecular; GSH = glutatona reduzida; GSSG = glutatona oxidada. Retirado e adaptado de Delbin *et al.*, 2009.

Existem três isoformas de SOD em mamíferos: 1) SOD-1, enzima citosólica que contém Cu e Zn; 2) SOD-2, enzima mitocondrial que contém Mn; e 3) SOD-3, enzima extracelular que também contém Cu e Zn (Poljsak, 2011). A SOD atua dismutando o O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. O peróxido de hidrogênio formado apresenta meia-vida longa, pode atravessar membranas celulares e gerar danos às estruturas celulares. A interação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais de transição livres leva à formação de OH<sup>•</sup>, provavelmente a ERO que induz mais alterações nos sistemas biológicos (Miller, 2012).

A metabolização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser realizada por peroxidases, como CAT e GPx. A CAT, presente nos peroxissomos, promove a catálise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, enquanto a GPx, presente no citosol e nas mitocôndrias, catalisa a reação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 GSH → GSSG + 2 H<sub>2</sub>O (Figura 4) (Murphy *et al.*, 2011). Portanto, ambas CAT e GPx impedem o acúmulo de peróxido de hidrogênio, impedindo a formação do radical hidroxil, contra o qual não há sistemas enzimáticos de defesa (Yu, 1994).

O estresse oxidativo está relacionado a diversas doenças, inclusive a HAP (Delbin *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2015). Ademais, a ET-1 é dita estimular a produção do ânion superóxido (Kowalczyk *et al.*, 2015). Estudos têm avaliado a atividade e a expressão das enzimas SOD, CAT e GPx na busca de relações de causa e consequência na doença, assim como intervenções que possam interferir nessas reservas antioxidantes, a fim de melhorar o quadro dos doentes (Souza-Rabbo *et al.*, 2008; Ludke *et al.*, 2010).

## 1.5 HIPERATIVIDADE SIMPÁTICA NA HIPERTENSÃO PULMONAR

O sistema nervoso autônomo (SNA) apresenta grande influência sobre o sistema cardiovascular, tanto pela ativação do sistema nervoso simpático (SNS), secretando noradrenalina e adrenalina, quanto pela ativação do sistema nervoso parassimpático (SNP), secretando acetilcolina (Angelis *et al.*, 2004). O SNS, muitas vezes ativado pelos barorreceptores localizados nos grandes vasos, é responsável pela modulação de efeitos cardiovasculares, tais como aumento da FC (cronotropismo positivo), aumento de contratilidade cardíaca (inotropismo positivo), melhora no relaxamento cardíaco (lusitropismo positivo), venoconstrição e constrição de vasos de resistência (Triposkiadis *et al.*, 2009; Lymperopoulos *et al.*, 2013). As fibras simpáticas distribuem-se pelos átrios e ventrículos, e por todos os vasos dos diferentes tecidos (Triposkiadis *et al.*, 2009). A ativação do SNP, por outro lado, tem como efeitos a diminuição do inotropismo e da FC. Ademais, nos vasos que possuem inervação vagal, ocorre o relaxamento indireto dos vasos, por meio da ativação da eNOS (Lymperopoulos *et al.*, 2013). Já as fibras parassimpáticas estão predominantemente localizadas nos átrios (Triposkiadis *et al.*, 2009).

Em situações em que há lesão miocárdica, a ativação aguda do SNS ocorre como uma resposta adaptativa com a finalidade de restaurar ou manter o débito cardíaco e níveis pressóricos, assim como manter a homeostase vascular (Angelis *et al.*, 2004). Desta forma, apesar da hiperatividade simpática ser inicialmente adaptativa, ela pode se estender quando não há recuperação da função cardíaca normal. Essa situação, a longo prazo, leva a efeitos deletérios e acelera a progressão da doença instalada (Triposkiadis *et al.*, 2009). Rubin (Rubin, 2015) descreve que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos também atuam sobre a vasculatura pulmonar, gerando proliferação celular endotelial e inflamação, e assim aumentando a gravidade da HAP.

Essa hiperatividade do SNS se traduz no envolvimento de duas catecolaminas que medeiam tais efeitos: noradrenalina (NA) e adrenalina (AD) (Velez-Roa *et al.*, 2004). Os mecanismos pelos quais esses hormônios atuam podem ser: 1) liberação de noradrenalina nos nodos sinoatrial e atrioventricular e no gânglio estrelado esquerdo, pelo qual a catecolamina atinge o ventrículo esquerdo; 2) liberação de adrenalina na circulação, pela medula adrenal, afetando o miocárdio e os vasos periféricos; e 3) liberação de ambas catecolaminas próximo a vasos sanguíneos e cardiomiócitos, agindo de forma parácrina (Triposkiadis *et al.*, 2009; Lymperopoulos *et al.*, 2013).

NA e AD ligam-se especificamente a receptores adrenérgicos (RA) transmembrana. Os RA, todos eles associados à proteína G, podem ser divididos em dois grupos: receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2) e receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3). Os receptores  $\alpha$  estão mais presentes nas artérias (pulmonares, aorta, coronárias e mesentéricas) do que no coração, e sua ativação por NA e AD é um importante fator de regulação do fluxo sanguíneo por meio da vasoconstrição (Triposkiadis *et al.*, 2009). O miocárdio saudável apresenta ambos receptores  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo 80% de predominância do receptor  $\beta$ 1. No coração insuficiente, a proporção dos receptores  $\beta$ 2 aumenta, podendo representar até 50% do total dos RA (Triposkiadis *et al.*, 2009).

Os receptores  $\beta$  cardíacos, mais especificamente  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2, são responsáveis pelos efeitos simpáticos supracitados, sendo sua ativação o mecanismo fisiológico mais potente para aumentar o desempenho cardíaco (Triposkiadis *et al.*, 2009). Esses receptores, quando ligados à NA ou AD, agem de diversas formas a fim de aumentar a disponibilidade de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, promovendo assim seus efeitos inotrópicos positivos. Os receptores  $\beta$ 3, que representam apenas 5% dos receptores cardíacos, são praticamente inativos em situações fisiológicas. Todavia, em situações de aumento de estímulo simpático, eles são acionados e atuam suavizando os efeitos de  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2, uma vez que os receptores  $\beta$ 3 produzem efeitos inotrópicos negativos (Triposkiadis *et al.*, 2009; Lympopoulos *et al.*, 2013).

## 1.6 BLOQUEADORES ADRENÉRGICOS

Devido as importantes funções no controle da função cardiovascular, os receptores  $\beta$ -adrenérgicos têm sido alvo de estudo e tratamento de diversas doenças, como a insuficiência cardíaca (IC) (White e Reinhart, 2009; Bandyopadhyay *et al.*, 2015; Black-Maier *et al.*, 2015). Os antagonistas desses receptores, chamados de  $\beta$ -bloqueadores, são classificados em três gerações: primeira geração, antagonistas não seletivos que ligam tanto em  $\beta$ 1 quanto em  $\beta$ 2; segunda geração, que apresentam maior afinidade pelo receptor  $\beta$ 1 que pelo  $\beta$ 2; e terceira geração: antagonistas não-seletivos  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 que apresentam também ação vasodilatadora por bloqueio dos receptores  $\alpha$ -1. De forma geral, todos  $\beta$ -bloqueadores apresentam propriedades cronotrópicas e inotrópicas negativas (López-Sendón *et al.*, 2004; Lympopoulos *et al.*, 2013).

Entre os efeitos protetores dos  $\beta$ -bloqueadores podemos citar: 1) inibição dos efeitos cardioprotetores de catecolaminas; 2) atenuação da vasoconstrição, do crescimento celular e de sistemas pró-apoptóticos (como o da ET-1); 3) melhora do fluxo coronariano; 4) restauração

de reflexos dos barorreceptores e quimiorreceptores; 5) melhora do desempenho cardíaco (por meio da redução de frequência cardíaca e demanda por oxigênio) 6) estimulação da enzima eNOS através da ação em  $\beta_3$  (Triposkiadis *et al.*, 2009; Lympelopoulos *et al.*, 2013).

Por muitas décadas, o uso de  $\beta$ -bloqueadores em pacientes com IC foi contraindicado, devido as ações cronotrópicas e inotrópicas negativas desses fármacos. Acreditava-se que, após a administração aos pacientes, esses apresentariam diminuição no débito cardíaco (DC) e, conseqüentemente, piora do quadro clínico (Batlouni e Albuquerque, 2000; White e Reinhart, 2009). Apesar de, agudamente, esses fármacos apresentarem certo grau de descompensação e piora dos sintomas, com doses iniciais baixas e com aumento gradual, há bloqueio da estimulação simpática nociva e diminuição da progressão da doença de forma efetiva (White e Reinhart, 2009). Segundo a III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica (Bocchi *et al.*, 2009), o uso de  $\beta$ -bloqueadores determina benefícios não só na redução dos sintomas, mas nas reinternações e óbitos, atuando na redução da progressão da disfunção ventricular esquerda e no remodelamento adverso.

## 1.7 BUCINDOLOL

O bucindolol é um  $\beta$ -bloqueador lipofílico, sintetizado no final da década de 1970 (Kreighbaum *et al.*, 1980). É metabolizado pelo fígado por meio do citocromo P450, principalmente a isoforma 2D6, assim como a maioria dos  $\beta$ -bloqueadores (Black-Maier *et al.*, 2015). Denominado  $\beta$ -bloqueador de terceira geração, atua em receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  e apresenta atividade antagonista adicional em  $\alpha$ -1, contribuindo para um efeito vasodilatador (Tabela 2). O bucindolol apresenta propriedade simpatolítica, ou seja, reduz os níveis de NA sistêmica, uma característica única quando comparado a outros  $\beta$ -bloqueadores (Batlouni e Albuquerque, 2000). No coração humano, a droga não apresenta atividade simpatomimética intrínseca (ASI) (Brixius *et al.*, 2001; Black-Maier *et al.*, 2015).

Tabela 2. Propriedades farmacológicas de seis  $\beta$ -bloqueadores.

Fármaco	Antagonismo em $\beta_1$	Antagonismo em $\beta_2$	Antagonismo em $\alpha$ -1	Redução de NA sistêmica	Ação antioxidante
Nebivolol	++++	+	0	0	0
Metoprolol	++++	++	0	0	0
Atenolol	++++	++	0	0	0
Bisoprolol	++++	+	0	0	0
Carvedilol	++++	++++	+++	0	+
Bucindolol	++++	++++	+	+++	0

Sinal "+" indica ação positiva e sinal "0" indica ação ausente. NA = noradrenalina. Retirado e adaptado de Batlouni e Albuquerque, 2000 e Black-Maier *et al.*, 2015.

Ensaios clínicos em pacientes com IC demonstraram que o bucindolol melhora a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, a contratilidade e o DC sem aumentar o consumo de oxigênio do miocárdio, além de exibir cronotropismo negativo e melhorar o relaxamento diastólico (White e Reinhart, 2009; Bandyopadhyay *et al.*, 2015; Black-Maier *et al.*, 2015).

### 1.7.1 Bucindolol e HAP

Atualmente não há recomendação de uso de  $\beta$ -bloqueadores para o tratamento da HAP (Rubin, 2015; Galiè *et al.*, 2016). Os tratamentos existentes incluem bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da fosfodiesterase, estimuladores de GMPC e análogos de prostaciclina. Como terapia de suporte, são indicados também anticoagulantes ou antiplaquetários, diuréticos, oxigênio e cardiotônicos, como a digoxina (Rubin, 2015; Galiè *et al.*, 2016).



Apesar disso, estudos com  $\beta$ -bloqueadores, incluindo bucindolol, têm sido realizados tanto em modelos animais de HAP quanto em pacientes, visto que o receptor  $\beta$ -adrenérgico parece ser um alvo promissor para a terapia da doença (Perros *et al.*, 2015; Rubin, 2015). Esses estudos demonstraram melhora na função cardíaca e retardo na progressão para a insuficiência do VD de pacientes com HAP (Van Campen *et al.*, 2013; Bandyopadhyay *et al.*, 2015; Rubin, 2015).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa, utilizando o modelo experimental de HAP (induzida por dose única de monocrotalina 60 mg/kg, i.p.) e tratamento com bucindolol (2 mg/kg, i.p. por 7 dias), demonstraram que o  $\beta$ -bloqueador promoveu efeitos na função sistólica. Foi observado aumento do DC e volume sistólico, que se relacionaram com a melhora da contratilidade. Este fármaco foi capaz de atenuar as alterações hemodinâmicas (pressão sistólica e diastólica final do VD), congestão pulmonar e elevação da mPAP, sinal clássico da HAP. A manifesta modulação do sistema nervoso autônomo cardíaco e vascular, através da redução do componente simpático e aumento do componente parassimpático, ocasionada pelo bucindolol foi o mecanismo para a atenuação da disfunção do VD observada pela patologia (Lima-Seolin, 2015).

## 1.8 MODELO EXPERIMENTAL DE HAP

O modelo mais utilizado para mimetizar a HAP é gerado através da administração de monocrotalina (Polonio *et al.*, 2012). A monocrotalina é um alcaloide pirrolizidínico presente nas plantas *Crotalaria spectabilis* (Figura 5A), facilmente encontradas em pastagens e plantações, uma vez que crescem abundantemente em zonas tropicais e subtropicais (Ryan *et al.*, 2013). A monocrotalina é metabolizada no fígado pelo citocromo P450 (subtipo CYP3A4) em seu metabólito ativo, a dehidromonocrotalina (Figura 5B), um agente alquilante altamente reativo que interage com o DNA e proteínas celulares. Acredita-se que um dos alvos do metabólito seja o complexo I da cadeia respiratória, e que esse teria maior afinidade pelos tecidos pulmonar e hepático. Além disso, o transporte da dehidromonocrotalina pelos glóbulos vermelhos, do fígado para o pulmão, aumentam a liberação do metabólito no endotélio pulmonar (Mingatto *et al.*, 2007).

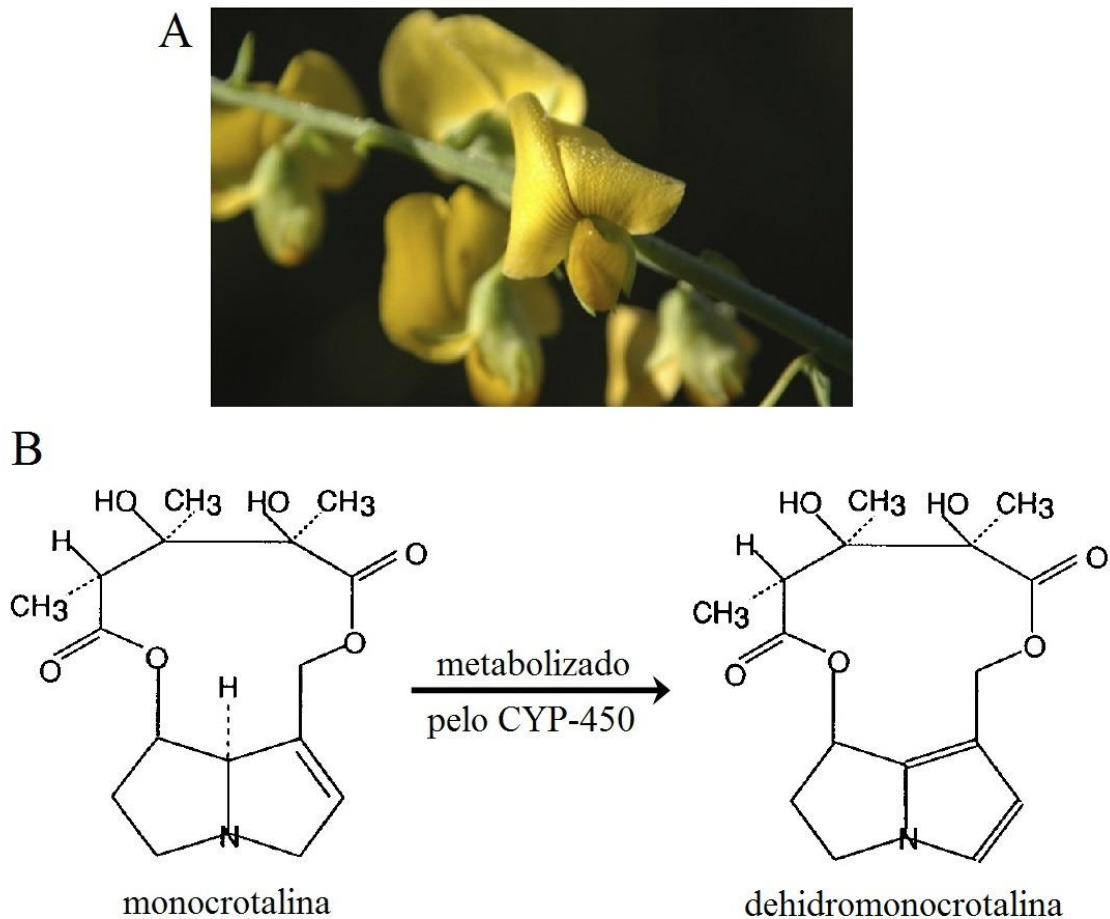


Figura 5. A) Foto da flor da *Crotalaria spectabilis*. Retirado e adaptado de Gomez-Arroyo *et al.*, 2011. B) Representação da metabolização da monocrotalina em dehidromonocrotalina pelo CYP-450. Retirado e adaptado de Pereira *et al.*, 1998.

O modelo de indução de HAP por meio da administração subcutânea ou intraperitoneal de monocrotalina (60 mg/kg, dose única) em ratos é o mais utilizado na pesquisa sobre a doença (Meyrick e Reid, 1979; Farahmand *et al.*, 2004; Ryan *et al.*, 2013). Se trata de um método simples, rápido e de baixo custo que, apesar de não mimetizar perfeitamente a HAP humana, apresenta muitas similaridades funcionais, bioquímicas e histológicas as apresentadas por pacientes. A ação do metabólito da monocrotalina promove, em ratos, o insulto inflamatório inicial da HAP, desencadeando diversos fatores observados também em humanos (Tuder e Voelkel, 1998). Entre esses fatores se destacam hipertrofia do VD, aumento da espessura da camada média da artéria pulmonar, aumento da mPAP e inflamação vascular pulmonar (Gomez-Arroyo *et al.*, 2012; Polonio *et al.*, 2012). Devido a isso, o modelo de monocrotalina pode ser considerado fiel o suficiente para o estudo da HAP humana (Ryan *et al.*, 2013).

Em ratos, as alterações endoteliais e o aumento de ERO podem ser observados 4 dias após a injeção de monocrotalina (Ryan *et al.*, 2011), enquanto alterações na camada média da vasculatura pulmonar são observadas sete dias após a aplicação da droga (Meyrick e Reid, 1979). Após mais uma semana, os animais já apresentam hipertrofia do ventrículo direito e mPAP aumentada, caracterizando a instalação da doença. Além disso, a administração da monocrotalina induz, em ratos, anormalidades na sinalização do óxido nítrico, dano ao DNA, ativação de fatores de crescimento e presença de infiltrado inflamatório vascular (Gomez-Arroyo *et al.*, 2012; Polonio *et al.*, 2012; Ryan *et al.*, 2013)

Nosso grupo de pesquisa possui experiência prévia na utilização desse modelo experimental. Ludke e colaboradores (2010) observaram que a administração intraperitoneal de monocrotalina em ratos *Wistar* machos levou ao remodelamento vascular, caracterizado pela degeneração endotelial e hipertrofia da camada média vascular pulmonar. A instalação da HAP foi observada pela hipertrofia do VD e presença aumentada de lipoperoxidação no pulmão dos animais. Além disso, alterações na expressão da enzima eNOS foram encontradas no pulmão, sugerindo alteração na sinalização induzida por óxido nítrico. Em outro estudo, Colombo e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos, no coração, do exercício físico em animais que receberam monocrotalina. Os mesmos parâmetros, além de elevação na mPAP, foram encontrados, evidenciando a reprodutibilidade do modelo. Em pesquisa mais recente (Lima-Seolin, 2015), foram avaliados os efeitos do bucindolol na modulação do remodelamento do VD e parâmetros funcionais cardíacos no mesmo modelo, porém sem a avaliação do tecido pulmonar.

## 2 JUSTIFICATIVA

A HAP é uma doença rara e de progressão rápida, que apresenta etiologia multifatorial. Devido aos sintomas iniciais serem inespecíficos, o diagnóstico geralmente é realizado em fases avançadas, onde a terapêutica tem eficácia limitada (Hooper e Granton, 2011; Simonneau *et al.*, 2013), sendo o tempo médio de sobrevivência após o diagnóstico de pouco maior que 10 anos (Ogawa *et al.*, 2014). A doença é ocasionada, principalmente, pelo remodelamento da vasculatura pulmonar e pelo aumento da espessura da túnica média, com consequente aumento progressivo da RVP e aumento da mPAP (McLaughlin *et al.*, 2015). Devido a isso, o VD fica sobrecarregado e o quadro de IC é instalado, constituindo a principal causa de morte dos pacientes (Bogaard *et al.*, 2009; Gerges *et al.*, 2015).

Apesar dos avanços em relação a opções de tratamento atuais, as terapias não demonstram efeitos sobre a reversão desta doença (Hooper *et al.*, 2016). Portanto, visto que a hiperatividade simpática é fator importante na progressão da doença, sendo correlacionada com a capacidade funcional do coração e prognóstico dos pacientes (Miyagawa e Emoto, 2014), sua modulação através da administração de  $\beta$ -bloqueadores surge como uma alternativa de tratamento interessante na tentativa de manter a função cardíaca e prevenir a progressão da doença (White e Reinhart, 2009).

Um estudo, em modelo experimental, apontou efeitos benéficos do  $\beta$ -bloqueador bucindolol, droga ainda não utilizada na clínica (Galiè *et al.*, 2016), tanto na prevenção da progressão da doença como na reversão de parâmetros clássicos da HAP, como: melhora da função do VD, diminuição da resistência vascular pulmonar e aumento da atividade parassimpática (Lima-Seolin, 2015). Contudo, esse estudo avaliou somente o sistema cardiovascular dos animais. Em vista de obter novas informações sobre os mecanismos envolvidos na atuação deste beta-bloqueador, o estudo do tecido pulmonar é essencial.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, no tecido pulmonar, mecanismos responsáveis pela redução da RVP promovida pelo bucindolol em modelo de HAP.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença ou ausência de infiltrado inflamatório na artéria pulmonar;
- Avaliar a espessura da artéria pulmonar;
- Mensurar o nível de lipoperoxidação em homogeneizado de tecido pulmonar, por meio da quantificação dos produtos reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Mensurar a atividade e imunoconteúdo das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx em homogeneizado de tecido pulmonar;
- Avaliar o imunoconteúdo das proteínas ET-A, ET-B e eNOS em homogeneizado de tecido pulmonar.

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO

**Beta-bloqueador bucindolol modula a razão dos receptores ETA/ETB e reverte o aumento de espessamento da artéria pulmonar em modelo de hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina**

Matheus M. Hennemann<sup>1</sup>, Bruna G. de Lima-Seolin<sup>1</sup>, Alessandra E. G. Godoy<sup>2</sup>, Isnard E. Litvin<sup>2</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Instituto de Pesquisas Clínicas para Estudos Multicêntricos, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil.

Autor Correspondente: Adriane Belló-Klein, Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite 500. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: +55 (51) 3308 3621. Email: [belklein@ufrgs.br](mailto:belklein@ufrgs.br)

## 1 RESUMO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é caracterizada pela hipertrofia da túnica média, que leva ao remodelamento vascular com subsequente aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e pressão média da artéria pulmonar (mPAP). Em resposta ao aumento da pós-carga, o ventrículo direito (VD) sofre hipertrofia e consequente insuficiência cardíaca (IC). Hoje sabe-se que o uso de  $\beta$ -bloqueadores atenua a progressão da IC. Visto isso, o objetivo desse estudo foi avaliar o desempenho do  $\beta$ -bloqueador bucindolol sobre componentes do sistema de sinalização das moléculas vasoativas óxido nítrico (NO) e endotelina-1 (ET-1), enzimas antioxidantes no tecido pulmonar e hipertrofia da artéria pulmonar no modelo experimental de HAP induzida pela monocrotalina.

Para tal, ratos Wistar machos foram divididos em 4 grupos: controle, monocrotalina, bucindolol e monocrotalina+bucindolol. HAP foi induzida através de dose única de monocrotalina (60 mg/kg,i.p.). Após 2 semanas, os animais foram tratados por 7 dias com bucindolol (2 mg/kg, i.p.) ou veículo. Ao final do tratamento, foram coletados os pulmões e a artéria pulmonar. No tecido pulmonar foram avaliadas atividade e expressão de enzimas antioxidantes, lipoperoxidação e expressão dos receptores A (ET-A) e B (ET-B) da ET-1 e da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Na artéria pulmonar (AP), foram avaliados a espessura da camada média e o infiltrado inflamatório.

O  $\beta$ -bloqueador bucindolol não apresentou efeitos sobre o estresse oxidativo, contudo foi capaz de reverter o aumento da espessura da parede da artéria pulmonar, possivelmente através da modulação da expressão do receptor A de endotelina-1. Portanto, esse poderia ser um dos mecanismos de atuação da droga que explique os efeitos funcionais benéficos encontrados nos animais com HAP.

Palavras-chave: bucindolol; monocrotalina; endotelina-1; eNOS; pulmão.

## 2 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma doença crônica rara, com incidência estimada de 10 a 52 casos por milhão de pessoas. É caracterizada pelo desequilíbrio entre moléculas vasoativas, como endotelina-1 (ET-1) e óxido nítrico (NO), causando remodelamento vascular pulmonar, com subsequente aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e pressão média da artéria pulmonar (mPAP)<sup>1; 2</sup>. Em resposta ao aumento da pós-carga<sup>3; 4</sup>, o ventrículo direito (VD) hipertrofia a fim de manter a função sistólica. Esse estresse de parede sustentado contribui para diversos fatores que levam o VD à insuficiência cardíaca (IC)<sup>5; 6</sup>. Sabe-se que a modulação do sistema nervoso autônomo (SNA), em resposta ao aumento da pós-carga é um bom fator de prognóstico na HAP, mas que, a longo prazo, a hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS) acelera a progressão desta doença<sup>7</sup>.

O bucindolol é um bloqueador adrenérgico que atua em receptores  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 e apresenta atividade de antagonista adicional em  $\alpha$ 1, contribuindo para um efeito vasodilatador<sup>8</sup>. Ademais, o bucindolol apresenta propriedade simpatolítica, característica única quando comparado a outros  $\beta$ -bloqueadores, e não demonstra evidências de atividade simpatomimética intrínseca (ISA) no coração humano<sup>9</sup>.

Em recente pesquisa, Lima-Seolin<sup>10</sup> demonstrou melhora na função sistólica do VD associada à redução da RVP (30%) e da mPAP (25%) em modelo de HAP, o que está relacionado através da reversão do desequilíbrio autonômico causado pela monocrotalina. O tratamento com bucindolol foi capaz de reduzir a componente simpático e aumentar a componente parassimpático, no entanto, seus efeitos sobre o tecido pulmonar são desconhecidos. É sabido que a ET-1 se encontra aumentada na HAP e se correlaciona diretamente com a severidade da doença<sup>11</sup>. Através da ação sobre seu receptor do tipo A (ET-A), a ET-1 medeia vasoconstrição e proliferação do músculo liso vascular e estimulação de inflamação local. Por sua vez, seu receptor do tipo B (ET-B) medeia vasodilatação através da produção de óxido nítrico (NO)<sup>12</sup>. Assim, alterações na expressão de seus receptores e o aumento da razão ET-A/ET-B estão associados ao remodelamento vascular prejudicial<sup>13</sup>. Níveis diminuídos do vasodilatador NO estão igualmente relacionados a este aumento da proliferação celular e inflamação local<sup>14</sup>. Sugere-se que as espécies reativas de oxigênio (ERO) atuem como segundos mensageiros intracelulares, mediando o remodelamento encontrado nas arteríolas e artérias pulmonares<sup>15</sup>. A redução das reservas antioxidantes tem sido associada à HAP, uma vez que a menor atividade das enzimas antioxidantes está relacionada com o aumento do dano tecidual, como a lipoperoxidação<sup>16; 17</sup>.



Tomando como base os benefícios neuro-hormonais do beta-bloqueador bucindolol descritos por Lima-Seolin<sup>10</sup>, o presente estudo visou avaliar quais os mecanismos responsáveis pela redução na pós-carga, avaliando os efeitos deste fármaco sobre o estresse oxidativo e sistemas de sinalização das moléculas vasoativas ET-1 e NO no parênquima pulmonar e sobre o remodelamento da artéria pulmonar promovido pela HAP.

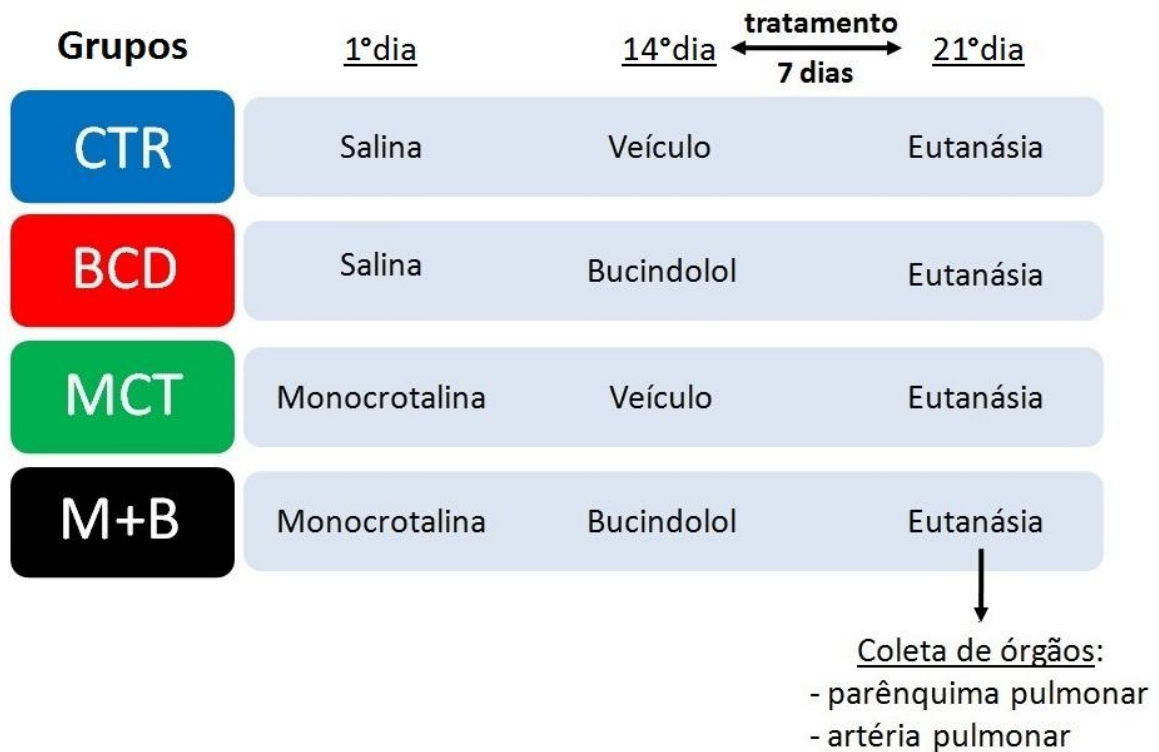
### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Aprovação ética

Todos procedimentos realizados nesse estudo estão de acordo com as recomendações da Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos e de acordo com os padrões éticos do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (protocolo de aprovação número 26244).

#### 3.2 Desenho experimental

Ratos *Wistar* machos pesando  $180 \pm 5$  g foram utilizados. Os animais, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, receberam água e ração comercial *ad libitum* e foram mantidos em temperatura (20 a 25°C) e umidade (70%) controladas e ciclo claro-escuro de 12 horas. Um total de 36 ratos foram utilizados. O tamanho amostral (n) para cada experimento está indicado na descrição de cada resultado apresentado. Os animais foram divididos em 4 grupos: 1) CTR: animais que não receberam monocrotalina e não receberam tratamento com bucindolol; 2) BCD: animais que não receberam monocrotalina e foram tratados com bucindolol; 3) MCT: animais que receberam monocrotalina e não receberam tratamento com bucindolol; e 4) M+B: animais que receberam monocrotalina e foram tratados com bucindolol.



**Figura 1.** Desenho experimental do estudo, evidenciando o período da injeção de monocrotalina e do tratamento com bucindolol. CTR = grupo controle; MCT = grupo monocrotalina; BCD = grupo bucindolol; M+B = grupo monocrotalina + bucindolol.

Os grupos monocrotalina (MCT e M+B) receberam dose única intraperitoneal (i.p.) de monocrotalina (60 mg/kg) (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, EUA). Os animais controle (CTR e BCD) receberam o mesmo volume de solução salina<sup>18; 19</sup>. Após 2 semanas, os animais foram tratados por 7 dias com bucindolol (2 mg/kg, i.p.) (Santa Cruz Biotechnology; CA, EUA) ou veículo (1% DMSO, 2% Tween 20, NaCl 0,9%)<sup>20</sup>. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilasina (10 mg/kg, i.p.)<sup>21</sup> e decapitados, com subsequente coleta dos órgãos (pulmões e artéria pulmonar) (Figura 1). A quantificação de todos os experimentos foi realizada por um observador cego ao desenho experimental.

### 3.3 Preparação dos tecidos

As amostras de parênquima pulmonar destinadas as análises bioquímicas foram homogeneizadas por 40 segundos em Ultra-turrax com solução de KCl 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 1 mM. Após centrifugação do homogeneizado a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi congelado em freezer (-80°C) até realização das medidas<sup>22</sup>.

As amostras de parênquima pulmonar destinadas as análises de expressão proteica foram homogeneizadas conforme previamente descrito<sup>23; 24</sup>.

### 3.4 Determinação da concentração proteica

A concentração de proteína no homogeneizado de pulmão foi determinada pelo método de Lowry<sup>25</sup>, utilizando albumina de soro bovino como padrão. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/ml.

### 3.5 Atividade enzimática

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada por meio da auto-oxidação do pirogalol, medida a 420 nm<sup>26</sup>. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/mg de proteína. A atividade da catalase (CAT) foi avaliada por meio do consumo de peróxido de hidrogênio em cubetas de quartzo<sup>27</sup>, medida a 240 nm. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína. A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi mensurada por meio do consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), medida a 340 nm<sup>28</sup>. Os resultados foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

### 3.6 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica foi medida colorimetricamente por meio da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)<sup>29; 30</sup>. O homogeneizado foi misturado com o ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% e aquecido em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Nessas condições, o TBA reage com os peróxidos lipídicos do tecido para formar malondialdeído (MDA), que é medido a 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar do MDA de 1,56 M/cm.

### 3.7 Análise da expressão proteica por *Western Blot*

As membranas foram processadas para a imunodeteção utilizando os seguintes anticorpos primários: receptor A da endotelina-1 (ET-A; 69 kDa), receptor B da endotelina-1 (ET-B; 50 kDa), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS; 140 kDa), superóxido dismutase 1 (SOD-1; 23 kDa), catalase (CAT; 64kDa), e glutathiona peroxidase (GPx; 22kDa) (Abcam, Cambridge, MA, BD Biosciences, Billerica, MA ou Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A ligação do anticorpo primário foi detectada pela conjugação dos anticorpos secundários ligado à peroxidase de rabanete. A quimiluminescência emitida foi detectada por filmes autorradiográficos que foram analisados utilizando o *software* ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD,

USA). A densidade óptica de cada amostra foi normalizada de acordo com o imunocnteúdo de  $\alpha$ -actinina (100 kDa) ou GAPDH (40 kDa).

### 3.8 Histologia

As artérias pulmonares foram imersas em formalina 4% e tamponadas por 24 horas. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina, em processamento de tecidos *overnight*. As lâminas histológicas foram preparadas contendo cortes com 3  $\mu$ m de espessura e coradas por hematoxilina-eosina (HE) e pela coloração de Tricrômio de Masson<sup>31; 32; 33</sup>, analisadas em microscópio óptico Leica, modelo DME com câmera fotográfica acoplada, modelo EC 3 (Leica Microsystems Inc.; New York, USA). As lâminas de artéria pulmonar foram analisadas em separado por dois médicos patologistas quanto à presença de infiltrado inflamatório e espessura da camada média vascular. O resultado final de cada amostra foi expresso pela média entre os valores dos dois observadores.

### 3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Sigma Plot (versão 12.0). O tamanho amostral foi calculado a partir de dados da literatura e estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa a fim obter  $\alpha = 0,05$  e poder estatístico de 95%. Foi feito teste de normalidade Shapiro-Wilk e os dados paramétricos foram analisados através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Student-Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As variáveis categóricas foram analisadas de forma descritiva e apresentadas como frequência relativa. A associação entre as variáveis foi calculada através do coeficiente de correlação de Pearson. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade do erro  $\alpha$  foi menor que 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes está expressa na tabela 1. A atividade da SOD aumentou 12% nos grupos que receberam monocrotalina (MCT e M+B) em relação aos grupos controle (CTR e BCD) ( $P=0,041$ ). O grupo MCT apresentou atividade desta enzima aumentada (18%) em relação ao seu controle (CTR) ( $P=0,032$ ), o que não foi observado comparando os grupos M+B e BCD ( $P=0,408$ ).

Tabela 1. Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) em homogeneizado de pulmão de ratos *Wistar* machos. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/kg. i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2 mg/kg/dia, i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental.

Atividade das enzimas antioxidantes	CTR	MCT	BCD	M+B
SOD (U/mg proteína)	4,53 ± 0,65	5,35 ± 0,39 •∇	5,23 ± 0,79	5,55 ± 0,54 •
CAT (nmol/min/mg proteína)	6,67 ± 1,38	6,89 ± 2,12	7,38 ± 1,68	6,66 ± 0,63
GPx (nmol/min/mg proteína)	0,021 ± 0,008	0,035 ± 0,009 •∇	0,030 ± 0,004	0,031 ± 0,008 •

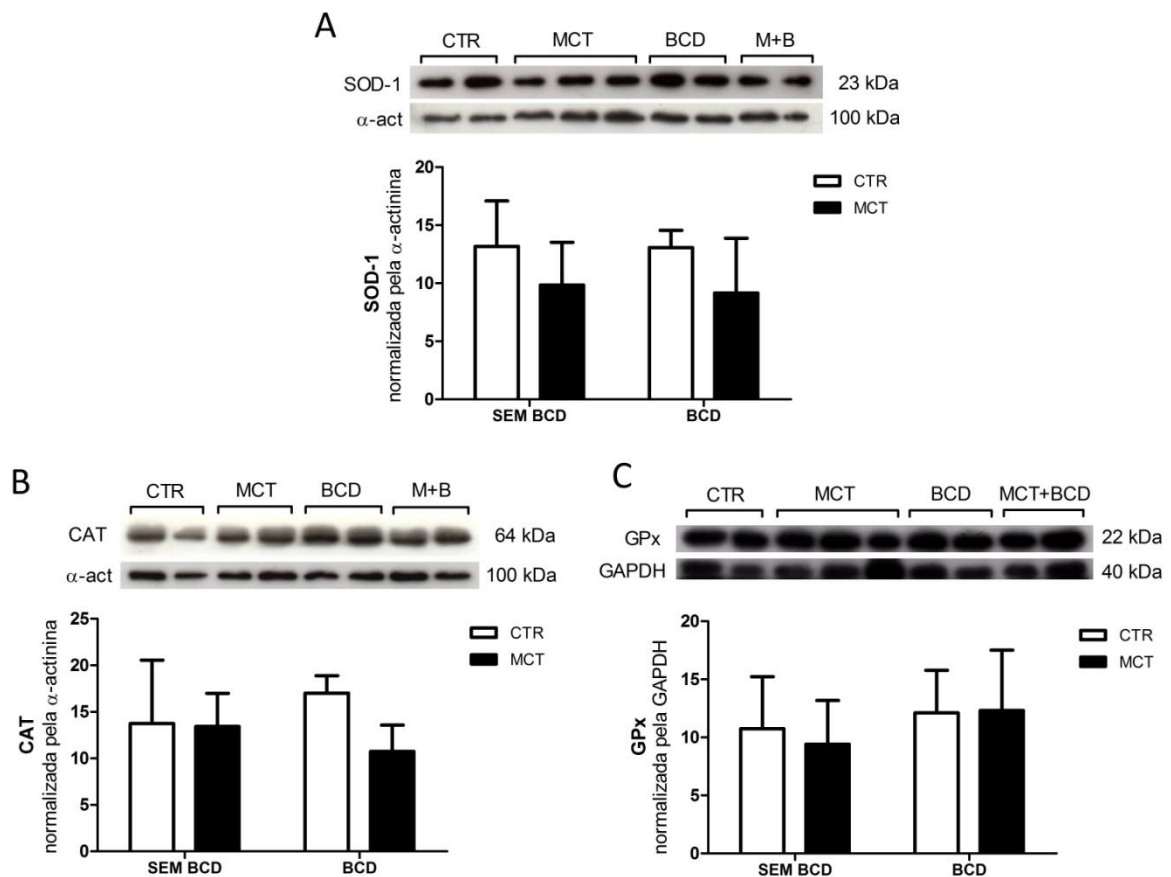
Os dados estão expressos como média ± desvio padrão de 4 a 6 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR: animais que receberam solução salina e veículo; BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

• Grupos MCT e M+B diferem significativamente em relação aos grupos CTR e BCD (SOD:  $P=0,041$ ; GPx:  $P=0,037$ ).

∇Grupo MCT difere significativamente em relação ao grupo CTR (SOD:  $P=0,032$ ; GPx:  $P=0,007$ ).

Não foram encontradas diferenças significativas entres os grupos em relação à atividade da CAT. Por outro lado, a atividade da GPx esteve aumentada (29%) nos grupos que receberam monocrotalina (MCT e M+B) em relação aos controles (CTR e BCD) ( $P=0,037$ ). Assim como para a SOD, o grupo MCT apresentou maior atividade (65%) em relação ao seu controle ( $P=0,007$ ), o que não foi observado comparando os grupos M+B e BCD ( $P=0,803$ ).

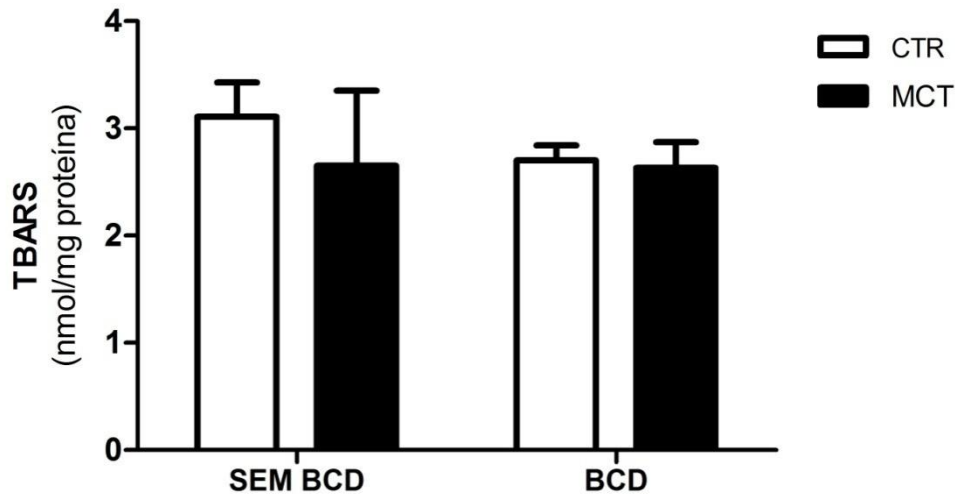
A expressão das enzimas antioxidantes SOD-1, CAT e GPx foi avaliada (Figura 2). Contudo, não foram observadas diferenças significativas entres os grupos para as três enzimas ( $P>0,05$ ).



**Figura 2.** Expressão de enzimas antioxidantes em homogeneizado de pulmão de ratos *Wistar* machos. A) superóxido dismutase 1 (SOD-1), B) catalase (CAT) e C) glutatona peroxidase (GPx). Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/kg. i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2 mg/kg/dia, i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 5 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $P>0,05$ ). CTR: animais que receberam solução salina e veículo; BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

#### 4.2 Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica foi avaliada através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 3). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $P>0,05$ ).

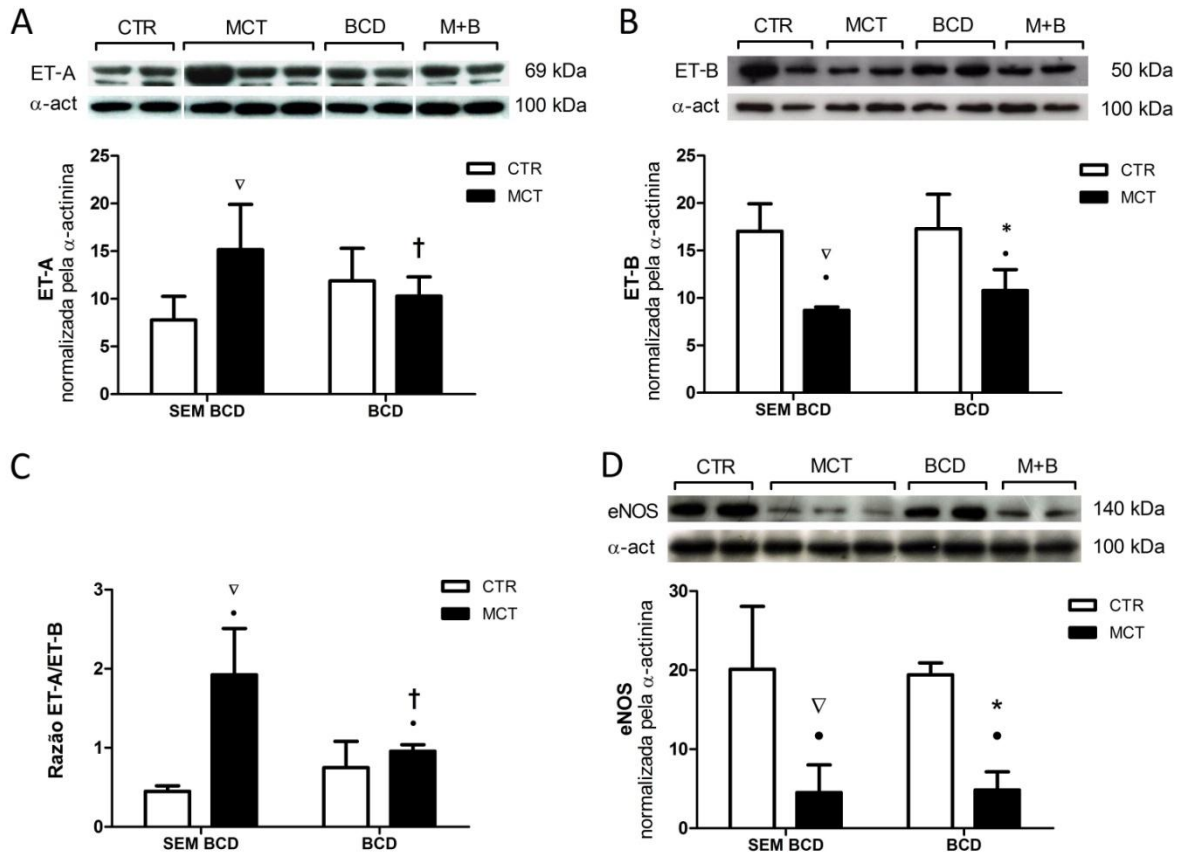


**Figura 3.** Medida de lipoperoxidação, avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogeneizado de pulmão de ratos *Wistar* machos. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/kg, i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2 mg/kg/dia, i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $P>0,05$ ). CTR: animais que receberam solução salina e veículo; BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

#### 4.3 Expressão de receptores da ET-1 e da enzima eNOS

No grupo MCT, foi encontrada uma maior expressão (95%) de ET-A (Figura 4A) em relação ao grupo CTR ( $P=0,007$ ). O bucindolol foi capaz de reverter esse aumento, uma vez que o grupo M+B apresentou expressão significativamente menor (32%) que o grupo MCT ( $P=0,044$ ). A expressão de ET-B (Figura 4B) foi menor (43%) nos animais que receberam monocrotalina (MCT e M+B) em relação aos controles (CTR e BCD) ( $P<0,001$ ). Separadamente, o grupo MCT teve menor expressão (49%) de ET-B que o grupo CTR ( $P=0,001$ ), assim como o grupo M+B em relação ao grupo BCD (38%) ( $P=0,005$ ).

A medida da razão de ET-A/ET-B (Figura 4C) esteve bastante aumentada (140%) nos animais que receberam monocrotalina (MCT e M+B) em relação aos controles (CTR e BCD) ( $P<0,001$ ). O grupo MCT apresentou maior razão (328%) ET-A/ET-B em relação ao grupo CTR ( $P<0,001$ ), o que não foi observado comparando os grupos M+B e BCD ( $P=0,352$ ). O grupo M+B, contudo, teve menor razão (50%) ET-A/ET-B do que o grupo MCT ( $P=0,001$ ), indicando um efeito protetor do bucindolol quanto ao remodelamento vascular.



**Figura 4.** Expressão de receptores da ET-1 e eNOS em homogeneizado de pulmão de ratos *Wistar* machos. A) receptor A da ET-1 (ET-A), B) receptor B da ET-1 (ET-B), C) razão entre a expressão de ET-A/ET-B e D) óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/kg. i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2 mg/kg/dia, i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 3 a 5 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. CTR: animais que receberam solução salina e veículo; BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

• Grupos MCT e M+B diferem significativamente em relação aos grupos CTR e BCD (ET-B:  $P < 0,001$ ; Razão ET-A/ET-B:  $P < 0,001$ ; eNOS:  $P < 0,001$ ).

∇ Grupo MCT difere significativamente em relação ao grupo CTR (ET-A:  $P = 0,007$ ; ET-B:  $P = 0,001$ ; Razão ET-A/ET-B:  $P < 0,001$ ; eNOS:  $P < 0,001$ ).

† Grupo M+B difere significativamente em relação ao grupo MCT (ET-A:  $P = 0,044$ ; Razão ET-A/ET-B:  $P = 0,001$ ).

\* Grupo MCT+BCD difere significativamente em relação ao grupo CTR+BCD (ET-B:  $P = 0,005$ ; eNOS:  $P < 0,001$ ).

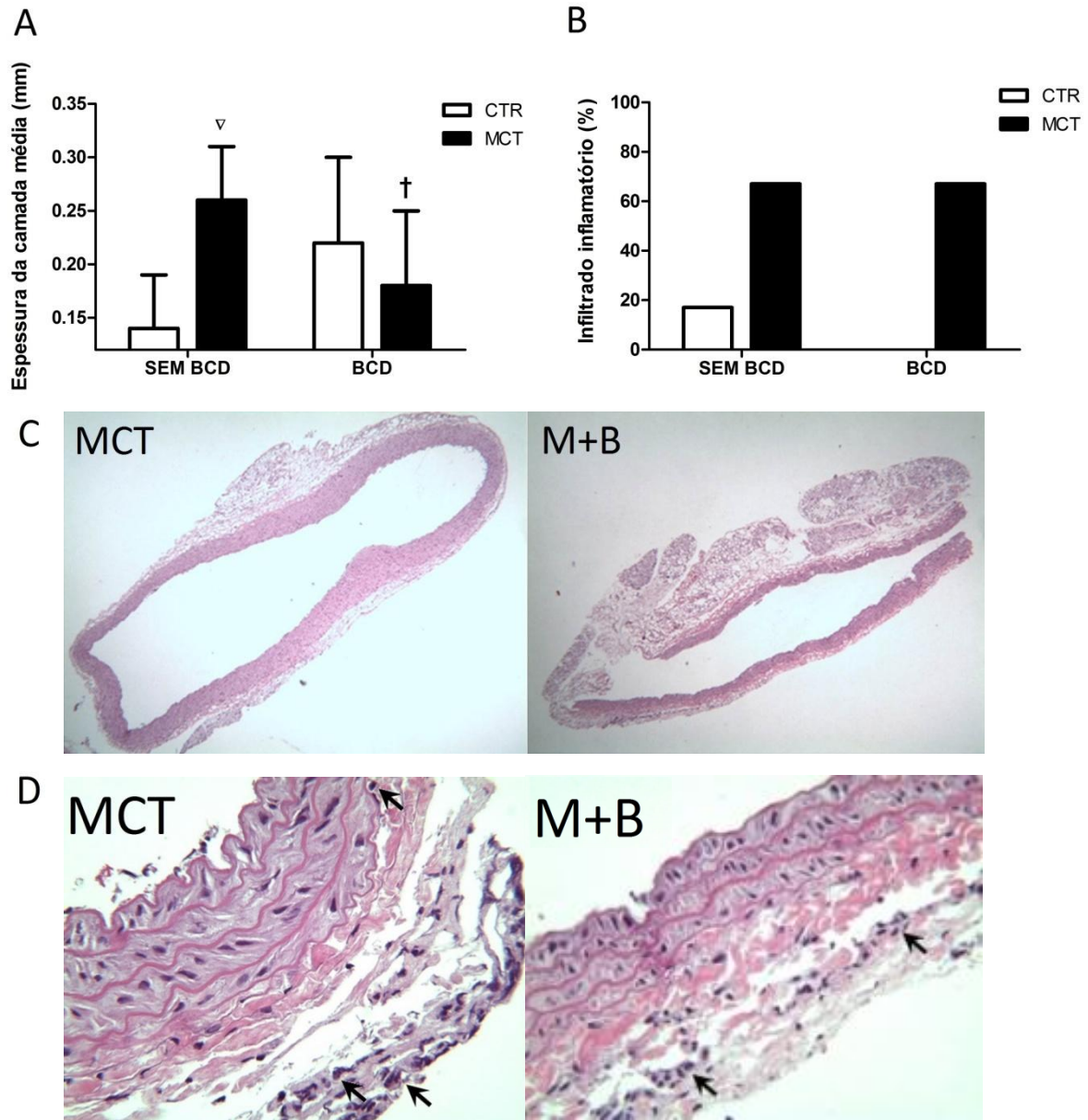
Quanto à expressão da enzima eNOS (Figura 4C), os grupos que receberam monocrotalina (MCT e M+B) apresentaram diminuição (76%) em relação aos controles (CTR e BCD) ( $P < 0,001$ ). O tratamento com bucindolol não foi capaz de reverter essa diminuição de expressão da eNOS dos animais M+B em relação aos do grupo MCT ( $P = 0,919$ ).



#### 4.4 Parâmetros histológicos

Cortes histológicos de artéria pulmonar foram analisados quanto à espessura da parede da artéria pulmonar e à presença de infiltrado inflamatório. A medida de espessura foi feita subtraindo a menor espessura da maior espessura do vaso, de modo que o valor expresso se refere ao delta de espessura da parede vascular (Figura 5A e 5C). O grupo MCT apresentou maior espessura (46%) que o grupo CTR ( $P=0,003$ ). Interessantemente, o bucindolol foi capaz de reverter esse aumento de espessura da camada média, visto que o grupo M+B apresentou menor espessura (33%) que o grupo MCT ( $P=0,014$ ).

Dos grupos que receberam monocrotalina (MCT e M+B), 67% dos animais apresentaram presença de infiltrado inflamatório (Figura 5B e 5D), enquanto no grupo CTR o percentual foi de 17% e no grupo BCD nenhum animal apresentou células inflamatórias na artéria pulmonar. O bucindolol parece não reverter a inflamação local instalada pela monocrotalina, visto que ambos grupos (MCT e M+B) apresentaram 67% dos animais com infiltrado inflamatório neste tecido.



**Figura 5.** Parâmetros histológicos da artéria pulmonar de ratos *Wistar* machos. A) Espessura da camada média (diferença entre espessura maior e espessura menor de cada anel), em mm. Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 10 animais por grupo. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. B) Presença de infiltrado inflamatório nos anéis. C e D) Fotos representativas de cortes histológicos de artéria pulmonar, corados com HE, aumento de 10x, dos grupos MCT e M+B, onde as setas indicam infiltrado inflamatório. Os dados estão expressos pela porcentagem de animais, 6 a 9 animais por grupo, com presença de infiltrado inflamatório. As variáveis categóricas foram analisadas de modo descritivo e estão apresentadas como frequência relativa. Os animais receberam injeção única de monocrotalina (60 mg/kg. i.p.) ou salina e após 14 dias foram tratados com bucindolol (2 mg/kg/dia, i.p.) ou veículo durante 7 dias. Resultados foram medidos ao final do protocolo experimental. CTR: animais que receberam solução salina e veículo; BCD: animais que receberam solução salina e bucindolol; MCT: animais que receberam monocrotalina e veículo; MCT+BCD: animais que receberam monocrotalina e bucindolol.

<sup>∇</sup> Grupo MCT SEM BCD difere significativamente em relação ao grupo CTR SEM BCD ( $P=0,003$ ).

<sup>†</sup> Grupo MCT+BCD difere significativamente em relação ao grupo MCT SEM BCD ( $P=0,014$ ).

#### 4.5 Correlações

Foram encontradas correlações (Tabela 2) entre diversos resultados já apresentados. A atividade de GPx e SOD estiveram correlacionadas significativamente de maneira positiva ( $P=0,001$ ). Ademais, a atividade de GPx esteve correlacionada de maneira negativa com a lipoperoxidação medida pelo TBARS ( $P=0,009$ ). A expressão de ET-A e a razão ET-A/ET-B estiveram correlacionadas positivamente com a espessura da camada média vascular ( $P=0,044$  e  $P=0,040$ , respectivamente). Outra correlação inversa encontrada foi entre a expressão da eNOS e a presença de infiltrado inflamatório ( $P=0,006$ ).

Tabela 2. Correlações entre resultados obtidos.

Fatores	n	r	P
Atividade de GPx e atividade de SOD	22	0,624	0,001
Atividade de GPx e TBARS	22	-0,539	0,009
Expressão de ET-A e espessura da camada média vascular	14	0,545	0,044
Razão ET-A/ET-B e espessura da camada média vascular	11	0,624	0,040
Expressão da eNOS e presença de infiltrado inflamatório	14	-0,689	0,006

n = número amostral; r = coeficiente de correlação; GPx = glutathiona peroxidase; SOD = superóxido dismutase; ET-A = receptor A da endotelina-1; ET-B = receptor B da endotelina-1; eNOS = óxido nítrico sintase endotelial.

## 5 DISCUSSÃO

Esse estudo demonstra, pela primeira vez, os efeitos do  $\beta$ -bloqueador bucindolol sobre a expressão dos receptores da endotelina-1 (ET-A e ET-B) e sua relação com a espessura da parede da artéria pulmonar em modelo de HAP. O bucindolol foi capaz de diminuir a razão dos receptores ETA/ETB na vasculatura pulmonar e assim, reverter o remodelamento da artéria pulmonar.

O modelo experimental de HAP induzida por monocrotalina reproduz as principais características da HAP idiopática em humanos<sup>34</sup>. A administração deste alcaloide vegetal leva à disfunção endotelial e consequente remodelamento das artérias e arteríolas pulmonares, resultando no aumento na RVP e mPAP<sup>35</sup>. O aumento da RVP induz uma sobrecarga ao VD, que sofre hipertrofia mal-adaptativa e evolui para IC, quadro denominado *cor pulmonale*<sup>5</sup>. De fato, as alterações bioquímicas, morfológicas e de imunociteúdo observadas no presente estudo estão de acordo com a literatura, confirmando que este modelo foi reproduzido com sucesso<sup>10; 34</sup>. As alterações encontradas no VD são o alvo das pesquisas atuais, sendo escassos os estudos que demonstrem a perda da homeostase do tecido pulmonar e sua modulação a partir de novas abordagens terapêuticas. Nesse estudo, foram avaliados os efeitos do  $\beta$ -bloqueador bucindolol sobre componentes do sistema de sinalização das moléculas vasoativas e enzimas antioxidantes do tecido pulmonar em modelo de HAP.

A administração da monocrotalina promove um dano às artérias e arteríolas pulmonares, e as consequências desse processo são a produção prejudicada de NO e aumentada de ET-1<sup>36</sup>. A produção diminuída de NO foi observada através da menor expressão de eNOS no pulmão dos animais com HAP. Essa enzima estimula a síntese da molécula vasodilatadora e anti-inflamatória NO no endotélio vascular. Sabe-se que os receptores da ET-1, ET-A e ET-B, têm papel importante na progressão da doença. O ET-A teve sua expressão aumentada no tecido pulmonar dos animais que receberam monocrotalina. Visto que o ET-A está presente nas células do músculo liso vascular e medeia vasoconstrição, a ligação da ET-1 a esse receptor parece ser um dos mecanismos desencadeadores da doença, o que está de acordo com a literatura<sup>37</sup>. Por outro lado, foi encontrada menor expressão de ET-B, receptor associado ao *clearance* da ET-1 e à vasodilatação. Esses resultados sugerem aumento de ET-1 circulante no tecido pulmonar<sup>38</sup> desses animais e, consequentemente, maior estímulo para a proliferação da musculatura lisa e ação inflamatória local<sup>12; 15</sup>. O aumento na razão ET-A/ET-B, encontrada nos animais que receberam monocrotalina, está igualmente relacionado ao maior remodelamento vascular<sup>13; 39</sup>. De fato, foi observado aumento

significativo na espessura da parede da artéria pulmonar desses animais, parâmetro diretamente associado à hipertrofia da túnica media, ao remodelamento da adventícia e à formação de neointima<sup>3;4</sup>.

Níveis aumentados de ET-1 e diminuídos de NO também estão associados a elevados níveis de  $O_2^{\cdot-}$  na HAP, acarretando a perda do equilíbrio redox e consequente estresse oxidativo<sup>40; 41</sup>. Entre os mecanismos de defesa antioxidante que metabolizam o  $O_2^{\cdot-}$  está a SOD<sup>42</sup>, cuja atividade foi aumentada nos animais que receberam monocrotalina. Um aumento na atividade de SOD sugere um aumento de seu produto,  $H_2O_2$ , advindo da dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ . As enzimas GPx e CAT impedem o acúmulo de  $H_2O_2$ , promovendo sua catálise até  $H_2O$ <sup>43</sup>. Na avaliação da atividade dessas enzimas, foi encontrado aumento de atividade da GPx nos animais que receberam monocrotalina, porém não foram observadas diferenças entre os grupos na atividade da CAT. Foram avaliadas também a expressão dessas três enzimas, porém não foram observadas diferenças entre os grupos. Sabe-se que a enzima GPx é estimulada na presença de estresse oxidativo leve. Caso isso não ocorra, a CAT é a enzima que atua sobre o  $H_2O_2$  quando em maiores concentrações<sup>44</sup>. Sendo assim, nesta janela temporal de 21 dias, não podemos afirmar que houve estresse oxidativo pulmonar, uma vez que as defesas enzimáticas também estavam elevadas. Corroborando com esta afirmação está a avaliação da lipoperoxidação, provocada, entre outros, pelo aumento dos níveis de  $O_2^{\cdot-}$ , que não foi alterada nos animais com HAP.

Modelos experimentais demonstram benefícios do uso de  $\beta$ -bloqueadores na HAP, contudo, as respostas encontradas, a longo prazo, são incertas<sup>10; 45; 46</sup>. Não obstante a evidência substancial de seus efeitos benéficos associados à possível hipotensão sistêmica, seu uso atualmente não é recomendado<sup>47; 48</sup>. Todavia, em recente pesquisa, o bucindolol promoveu, através da modulação do SNA, melhora da função sistólica e foi capaz de atenuar as alterações hemodinâmicas sem causar hipotensão nos animais, além de promover redução na mPAP e RVP<sup>8;10</sup>.

No presente estudo, os animais com HAP tratados com bucindolol apresentaram redução nos níveis de ET-A. Porém, o tratamento não alterou a expressão de ET-B. Esses resultados, contudo, levaram a uma diminuição significativa na razão ET-A/ET-B nos animais tratados com o  $\beta$ -bloqueador, indicando uma possível reversão do remodelamento vascular adverso e espessamento vascular. Isso, de fato, foi observado, uma vez que o grupo M+B apresentou menor espessura da artéria pulmonar em relação ao grupo MCT<sup>49</sup>. O infiltrado inflamatório, observado na artéria pulmonar dos animais que receberam monocrotalina, não

foi diminuído pelo bucindolol. Relacionada ao aumento do infiltrado inflamatório está a diminuição da expressão da eNOS encontrada nos animais com HAP. O produto dessa enzima, o NO, é uma molécula com propriedades anti-inflamatórias, e sua modulação também não ocorreu após o tratamento com bucindolol. Esse resultado era esperado, uma vez que o  $\beta$ -bloqueador não atua em  $\beta_3$ , receptor relacionado à modulação da eNOS<sup>49</sup>. Da mesma forma, o tratamento não alterou a atividade e a expressão das enzimas antioxidantes, assim como os níveis de lipoperoxidação, resultado esperado visto que o bucindolol não apresenta atividade antioxidante<sup>8</sup>.

O presente estudo demonstra que o  $\beta$ -bloqueador bucindolol foi capaz de reverter o aumento da espessura da parede da artéria pulmonar, possivelmente através da modulação da expressão do receptor A de endotelina-1. Provavelmente, este é o mecanismo pelo qual o bucindolol atua na diminuição da mPAP e da RVP, encontrados por Lima-Seolin<sup>10</sup>. Mais estudos são necessários para avaliação dos exatos mecanismos pelos quais o bucindolol exerce seus efeitos cardioprotetores, observados em estudos prévios do nosso grupo<sup>10</sup>. A avaliação dos níveis plasmáticos de ET-1, acompanhado da mensuração dos níveis do ânion superóxido e reatividade da artéria pulmonar poderão acrescer no entendimento dos efeitos benéficos do bucindolol em animais com hipertensão arterial pulmonar.

#### APOIO FINANCEIRO

Esse trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

#### CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## 6 REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> HOEPER, M. M. et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 25 Suppl, p. D42-50, Dec 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355641> >.
- <sup>2</sup> KIELY, D. G. et al. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. **BMJ**, v. 346, p. f2028, 2013. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592451> >.
- <sup>3</sup> MCLAUGHLIN, V. V. et al. Management of pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 18, p. 1976-97, May 2015. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25953750> >.
- <sup>4</sup> MONTANI, D. et al. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. **Pharmacol Ther**, v. 141, n. 2, p. 172-91, Feb 2014. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24134901> >.
- <sup>5</sup> BOGAARD, H. J. et al. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. **Chest**, v. 135, n. 3, p. 794-804, Mar 2009. ISSN 1931-3543. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265089> >.
- <sup>6</sup> MCGOON, M. D. et al. Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 25 Suppl, p. D51-9, Dec 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355642> >.
- <sup>7</sup> BANDYOPADHYAY, D. et al. Outcomes of  $\beta$ -blocker use in pulmonary arterial hypertension: a propensity-matched analysis. **Eur Respir J**, v. 46, n. 3, p. 750-60, Sep 2015. ISSN 1399-3003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022959> >.
- <sup>8</sup> BLACK-MAIER, E.; STEINBERG, B. A.; PICCINI, J. P. Bucindolol hydrochloride in atrial fibrillation and concomitant heart failure. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 13, n. 6, p. 627-36, Jun 2015. ISSN 1744-8344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25959096> >.
- <sup>9</sup> BRIXIUS, K. et al. Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. **Br J Pharmacol**, v. 133, n. 8, p. 1330-8, Aug 2001. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498519> >.
- <sup>10</sup> LIMA-SEOLIN, B. G. D. **Efeitos do beta-bloqueador bucindolol na modulação do remodelamento do ventrículo direito em modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina**. 2015. (Mestrado). Departamento Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- <sup>11</sup> MIYAGAWA, K.; EMOTO, N. Current state of endothelin receptor antagonism in hypertension and pulmonary hypertension. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, v. 8, n. 5, p. 202-16, Oct 2014. ISSN 1753-9455. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24990369> >.

- <sup>12</sup> ZAMORA, M. A. et al. BQ123, an ETA receptor antagonist, inhibits endothelin-1-mediated proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 9, n. 4, p. 429-33, Oct 1993. ISSN 1044-1549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8398181> >.
- <sup>13</sup> KUC, R. E. et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension. **Life Sci**, v. 118, n. 2, p. 391-6, Nov 2014. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582810> >.
- <sup>14</sup> CROSSWHITE, P.; SUN, Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. **J Hypertens**, v. 28, n. 2, p. 201-12, Feb 2010. ISSN 1473-5598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20051913> >.
- <sup>15</sup> SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascul Pharmacol**, v. 71, p. 40-56, Aug 2015. ISSN 1879-3649. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25869516> >.
- <sup>16</sup> BRITO, R. et al. Oxidative stress in hypertension: mechanisms and therapeutic opportunities. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 123, n. 6, p. 325-35, Jun 2015. ISSN 1439-3646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25918881> >.
- <sup>17</sup> KYAW, M. et al. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, n. 8, p. 977-85, Aug 2004. ISSN 1671-4083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15301727> >.
- <sup>18</sup> FARAHMAND, F.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. **Mol Cell Biochem**, v. 260, n. 1-2, p. 21-9, May 2004. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15228082> >.
- <sup>19</sup> WERCHAN, P. M. et al. Right ventricular performance after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Am J Physiol**, v. 256, n. 5 Pt 2, p. H1328-36, May 1989. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2524170> >.
- <sup>20</sup> BAKER, J. G. et al. Predicting in vivo cardiovascular properties of  $\beta$ -blockers from cellular assays: a quantitative comparison of cellular and cardiovascular pharmacological responses. **FASEB J**, v. 25, n. 12, p. 4486-97, Dec 2011. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865315> >.
- <sup>21</sup> FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 4. San Diego: Academic Press, 2015.
- <sup>22</sup> LLESUY, S. F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori**, v. 71, n. 3, p. 241-9, Jun 1985. ISSN 0300-8916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3861023> >.
- <sup>23</sup> ARAUJO, A. S. et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. **Mol Cell Endocrinol**, v. 249, n. 1-2, p. 133-9, Apr 2006. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16574313> >.



- <sup>24</sup> LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.
- <sup>25</sup> LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713> >.
- <sup>26</sup> MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 1974. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215654> >.
- <sup>27</sup> AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.
- <sup>28</sup> FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659> >.
- <sup>29</sup> BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633> >.
- <sup>30</sup> OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, v. 95, n. 2, p. 351-8, Jun 1979. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810> >.
- <sup>31</sup> LILLIE, R. D.; FULLMER, H. M. **Histopatologic technic and practical histochemistry**. 4. New York: McGraw-Hill, 1976. 942
- <sup>32</sup> SHEEHAN, D. C.; HRAPCHAK, B. B. **Theory and practice of histotechnology**. 2. Columbus: Battelle Press, 1987.
- <sup>33</sup> LUNA, L. G. **Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts**. Michigan: American Histolabs, 1992. 767
- <sup>34</sup> RYAN, J. J.; MARSBOOM, G.; ARCHER, S. L. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. **Handb Exp Pharmacol**, v. 218, p. 105-49, 2013. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092338> >.
- <sup>35</sup> TUDER, R. M.; VOELKEL, N. F. Pulmonary hypertension and inflammation. **J Lab Clin Med**, v. 132, n. 1, p. 16-24, Jul 1998. ISSN 0022-2143. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665367> >.
- <sup>36</sup> TUDER, R. M. et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 25 Suppl, p. D4-12, Dec 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355640> >.
- <sup>37</sup> GALIÉ, N.; MANES, A.; BRANZI, A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. **Cardiovasc Res**, v. 61, n. 2, p. 227-37, Feb 2004. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14736539> >.

- 38 FUKURODA, T. et al. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 199, n. 3, p. 1461-5, Mar 1994. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8147891> >.
- 39 KEDZIERSKI, R. M.; YANAGISAWA, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 851-76, 2001. ISSN 0362-1642. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264479> >.
- 40 CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002. ISSN 0102-8650. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502002000600011&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502002000600011&nrm=iso) >.
- 41 KOWALCZYK, A. et al. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 63, n. 1, p. 41-52, Feb 2015. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288367> >.
- 42 POLJSAK, B. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2011/194586> >.
- 43 MURPHY, M. P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell Metab**, v. 13, n. 4, p. 361-6, Apr 2011. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459321> >.
- 44 LUSHCHAK, V. I. Classification of oxidative stress based on its intensity. **EXCLI J**, v. 13, p. 922-37, 2014. ISSN 1611-2156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417312> >.
- 45 DE MAN, F. S. et al. Bisoprolol delays progression towards right heart failure in experimental pulmonary hypertension. **Circ Heart Fail**, v. 5, n. 1, p. 97-105, Jan 2012. ISSN 1941-3297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22157723> >.
- 46 BOGAARD, H. J. et al. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 182, n. 5, p. 652-60, Sep 2010. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508210> >.
- 47 GALIÈ, N. et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). **Eur Heart J**, v. 37, n. 1, p. 67-119, Jan 2016. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320113> >.
- 48 DE MAN, F. S.; HANDOKO, M. L.  $\beta$ -blockers in pulmonary arterial hypertension: evolving concepts of right heart failure. **Eur Respir J**, v. 46, n. 3, p. 619-21, Sep 2015. ISSN 1399-3003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26324694> >.

- <sup>49</sup> PERROS, F. et al. Nebivolol for improving endothelial dysfunction, pulmonary vascular remodeling, and right heart function in pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 7, p. 668-80, Feb 2015. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677428> >.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho foi possível observar alterações estruturais da túnica média da artéria pulmonar e presença de células inflamatórias nesse vaso nos animais que receberam monocrotalina. O  $\beta$ -bloqueador bucindolol foi capaz de reverter o espessamento da camada média da artéria pulmonar, porém não teve influência sobre o infiltrado inflamatório na AP dos animais tratados. Quanto à expressão dos receptores da endotelina-1 no parênquima pulmonar, o ET-A esteve aumentado nos animais que receberam a monocrotalina, parâmetro que foi revertido pelo tratamento com bucindolol. O ET-B esteve diminuído nos animais que receberam monocrotalina, porém o bucindolol não teve influência na expressão desses receptores. A razão ET-A/ET-B esteve aumentada nos animais doentes, sendo um indicativo de proliferação da musculatura lisa e de remodelamento vascular. O bucindolol foi capaz de reverter essa medida, indicando menor remodelamento e diminuição da camada muscular. A monocrotalina levou à diminuição na expressão de eNOS, parâmetro que não sofreu alteração após administração do bucindolol. Acerca da atividade de enzimas antioxidantes, os animais doentes apresentam maior atividade da SOD e da GPx, porém nenhuma alteração na atividade da CAT. O tratamento com bucindolol não afetou a atividade enzimática. Se houve alteração na atividade enzimática, por outro lado, não foram observadas alterações quanto à expressão das enzimas SOD-1, CAT e GPx. Tanto a monocrotalina quanto o bucindolol não promoveram alteração nos níveis de lipoperoxidação.

As perspectivas desse trabalho incluem a dosagem da ET-1 no plasma, medida de nitritos e nitratos plasmáticos, avaliação da reatividade vascular da artéria pulmonar, avaliação da sobrevivência dos animais tratados com bucindolol, avaliação da atividade simpática e parassimpática e dosagem sérica de noradrenalina e adrenalina.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, S. et al. Sympathetic nervous system activation and  $\beta$ -adrenoceptor blockade in right heart failure. **Eur J Heart Fail**, v. 17, n. 4, p. 358-66, Apr 2015. ISSN 1879-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25704592> >.
- ANGELIS, K.; SANTOS, M. D. S. B.; IRIGOYEN, M. C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 3, p. 7, 2004.
- BALIGA, R. S.; MACALLISTER, R. J.; HOBBS, A. J. Vasoactive peptides and the pathogenesis of pulmonary hypertension: role and potential therapeutic application. **Handb Exp Pharmacol**, v. 218, p. 477-511, 2013. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092352> >.
- BATLOUNI, M.; DE ALBUQUERQUE, D. C. Beta-adrenergic blocking agents in heart failure. **Arq Bras Cardiol**, v. 75, n. 4, p. 339-60, Oct 2000. ISSN 0066-782X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11058931> >.
- BENZA, R. L. et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 164-72, Jul 2010. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585012> >.
- BOCCHI, E. A. et al. III Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 1, p. 3-70, 2009. ISSN 0066-782X.
- CALLERA, G. et al. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, v. 5, n. 3, p. 531-52, May 2007. ISSN 1744-8344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17489676> >.
- CHIN, K. M.; RUBIN, L. J. Pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 51, n. 16, p. 1527-38, Apr 2008. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420094> >.
- COLOMBO, R. et al. Effects of exercise on monocrotaline-induced changes in right heart function and pulmonary artery remodeling in rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 91, n. 1, p. 38-44, Jan 2013. ISSN 1205-7541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23368696> >.
- COOL, C. D. et al. Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. **Am J Pathol**, v. 155, n. 2, p. 411-9, Aug 1999. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433934> >.
- DAVIE, N. et al. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 165, n. 3, p. 398-405, Feb 2002. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818328> >.

DELBIN, M. A.; ANTUNES, E.; ZANESCO, A. Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 4, p. 552-61, 2009 Oct-Dec 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305929> >.

DINH, Q. N. et al. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 406960, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136585> >.

GERGES, M. et al. Pulmonary Hypertension in Heart Failure. Epidemiology, Right Ventricular Function, and Survival. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 192, n. 10, p. 1234-46, Nov 2015. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26181215> >.

GERSCHMAN, R. et al. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, n. 3097, p. 623-6, May 1954. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13156638> >.

GOMEZ-ARROYO, J. G. et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 302, n. 4, p. L363-9, Feb 2012. ISSN 1522-1504. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964406> >.

GRAHAM, B. B. et al. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. **Chest**, v. 137, n. 6 Suppl, p. 20S-29S, Jun 2010. ISSN 1931-3543. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522577> >.

HOEPER, M. M.; GRANTON, J. Intensive care unit management of patients with severe pulmonary hypertension and right heart failure. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 184, n. 10, p. 1114-24, Nov 2011. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700906> >.

HOEPER, M. M. et al. A global view of pulmonary hypertension. **Lancet Respir Med**, Mar 2016. ISSN 2213-2619. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26975810> >.

HOEPER, M. M.; SIMON R GIBBS, J. The changing landscape of pulmonary arterial hypertension and implications for patient care. **Eur Respir Rev**, v. 23, n. 134, p. 450-7, Dec 2014. ISSN 1600-0617. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445943> >.

HUMBERT, M. et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 43, n. 12 Suppl S, p. 13S-24S, Jun 2004. ISSN 0735-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194174> >.

HUMBERT, M. et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. **Circulation**, v. 122, n. 2, p. 156-63, Jul 2010. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20585011> >.

KREIGHBAUM, W. E. et al. Antihypertensive indole derivatives of phenoxypropanolamines with beta-adrenergic receptor antagonist and vasodilating activity. **J Med Chem**, v. 23, n. 3, p. 285-9, Mar 1980. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6102605> >.

KUC, R. E. et al. Modulation of endothelin receptors in the failing right ventricle of the heart and vasculature of the lung in human pulmonary arterial hypertension. **Life Sci**, v. 118, n. 2, p. 391-6, Nov 2014. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24582810> >.

LAPA, M. et al. Cardiopulmonary manifestations of hepatosplenic schistosomiasis. **Circulation**, v. 119, n. 11, p. 1518-23, Mar 2009. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273723> >.

LUDKE, A. R. et al. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 55, n. 1, p. 89-95, Jan 2010. ISSN 1533-4023. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19904214> >.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 156-67, Feb 2008. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167491> >.

LYMPEROPOULOS, A.; RENGO, G.; KOCH, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. **Circ Res**, v. 113, n. 6, p. 739-53, Aug 2013. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23989716> >.

LÓPEZ-SENDÓN, J. et al. Expert consensus document on beta-adrenergic receptor blockers. **Eur Heart J**, v. 25, n. 15, p. 1341-62, Aug 2004. ISSN 0195-668X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288162> >.

MALENFANT, S. et al. The emergence of new therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension: from now to the near future. **Expert Rev Respir Med**, v. 7, n. 1, p. 43-55, Feb 2013. ISSN 1747-6356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23362814> >.

MEYRICK, B.; REID, L. Development of pulmonary arterial changes in rats fed *Crotalaria spectabilis*. **Am J Pathol**, v. 94, n. 1, p. 37-50, Jan 1979. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/153714> >.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. **FEBS Lett**, v. 586, n. 5, p. 585-95, Mar 2012. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079668> >.

MINGATTO, F. E. et al. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol**, v. 50, n. 5, p. 724-30, Oct 2007. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17669457> >.

OGAWA, A.; EJIRI, K.; MATSUBARA, H. Long-term patient survival with idiopathic/heritable pulmonary arterial hypertension treated at a single center in Japan. **Life Sci**, v. 118, n. 2, p. 414-9, Nov 2014. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530872> >.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348> >.

PEACOCK, A. J. et al. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J**, v. 30, n. 1, p. 104-9, Jul 2007. ISSN 0903-1936. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360728> >.

PEDRAM, A. et al. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. **J Biol Chem**, v. 272, n. 27, p. 17097-103, Jul 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202027> >.

PEREIRA, T. N. et al. Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. **Nucleic Acids Res**, v. 26, n. 23, p. 5441-7, Dec 1998. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826770> >.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J Clin Biochem**, v. 30, n. 1, p. 11-26, Jan 2015. ISSN 0970-1915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25646037> >.

POLONIO, I. B. et al. Comparison of two experimental models of pulmonary hypertension. **J Bras Pneumol**, v. 38, n. 4, p. 452-60, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1806-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964929> >.

RUBIN, L. J. The beta-adrenergic receptor in pulmonary arterial hypertension: a novel therapeutic target? **J Am Coll Cardiol**, v. 65, n. 7, p. 681-3, Feb 2015. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677429> >.

RYAN, J.; BLOCH, K.; ARCHER, S. L. Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. **Int J Clin Pract Suppl**, n. 172, p. 15-34, Aug 2011. ISSN 1368-504X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21736677> >.

SHAO, D.; PARK, J. E.; WORT, S. J. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. **Pharmacol Res**, v. 63, n. 6, p. 504-11, Jun 2011. ISSN 1096-1186. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419223> >.

SHIVAKUMAR, K.; KARTHA, C. Endothelin - a novel regulatory peptide. **Current Science**, v. 62, n. 7, p. 6, 1992. Disponível em: < [http://www.currentscience.ac.in/Downloads/article\\_id\\_062\\_07\\_0513\\_0518\\_0.pdf](http://www.currentscience.ac.in/Downloads/article_id_062_07_0513_0518_0.pdf) >.

SHUJAAT, A.; MINKIN, R.; EDEN, E. Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 2, n. 3, p. 273-82, 2007. ISSN 1176-9106. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18229565> >.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, n. 2, p. 291-5, Mar 1997. ISSN 0958-0670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9129943> >.

SIMONNEAU, G. et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 25 Suppl, p. D34-41, Dec 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24355639> >.

SOUZA-RABBO, M. P. et al. Effects of a chronic exercise training protocol on oxidative stress and right ventricular hypertrophy in monocrotaline-treated rats. **Clin Exp Pharmacol**



**Physiol**, v. 35, n. 8, p. 944-8, Aug 2008. ISSN 1440-1681. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18430062> >.

STUEHR, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 217-30, May 1999. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10320659> >.

SUN, X. et al. Endothelin-1 induces a glycolytic switch in pulmonary arterial endothelial cells via the mitochondrial translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 50, n. 6, p. 1084-95, Jun 2014. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392990> >.

TRIPOSKIADIS, F. et al. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 19, p. 1747-62, Nov 2009. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874988> >.

VAN CAMPEN, J. et al. The effects of beta-blocker therapy on heart rate, symptoms and exercise in pulmonary arterial hypertension. **European Respiratory Journal**, v. 42, n. Suppl 57, 2013-09-01 00:00:00 2013. Disponível em: < [http://erj.ersjournals.com/content/erj/42/Suppl\\_57/P4061.full.pdf](http://erj.ersjournals.com/content/erj/42/Suppl_57/P4061.full.pdf) >.

VELEZ-ROA, S. et al. Increased sympathetic nerve activity in pulmonary artery hypertension. **Circulation**, v. 110, n. 10, p. 1308-12, Sep 2004. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337703> >.

WHITE, C. M.; REINHART, K. M. Bucindolol: A beta-blocker for the treatment of heart failure. 2009.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, v. 74, n. 1, p. 139-62, Jan 1994. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8295932> >.

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA VASCULAR PHARMACOLOGY



### VASCULAR PHARMACOLOGY

A journal of Vascular Biology and Medicine

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.3</b>



ISSN: 1537-1891

#### DESCRIPTION

*Vascular Pharmacology* publishes papers, which contains results of all aspects of **biology** and **pharmacology** of the **vascular system**.

Papers are encouraged in basic, translational and clinical aspects of Vascular Biology and Pharmacology, utilizing approaches ranging from **molecular biology** to **integrative physiology**. All papers are in English.

The Journal publishes review articles which include vascular aspects of **thrombosis, inflammation, cell signalling, atherosclerosis, and lipid metabolism**.

##### Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

[backbanner.gif](#) [ScienceDirect](#) [Backfiles](#)

#### AUDIENCE

Researchers in pharmacology, clinical pharmacology and kinetics and metabolism studies related to drug action.

#### IMPACT FACTOR

2014: 3.635 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### *Your Paper Your Way*

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

**To find out more, please visit the Preparation section below.**

### INTRODUCTION

*Vascular Pharmacology* publishes papers, written in English, which contain results of all aspects of biology and pharmacology of the vascular system.

Papers are encouraged in all areas, including angiogenesis, growth factors, nitric oxide, cell signaling, vasoactive mediators, hypertension, atherosclerosis, metabolic diseases, blood element-vessel wall interactions, thrombosis, micro-circulation, vascular developmental biology and remodeling, vascular inflammation and immunity. Papers are encouraged on pharmacological research utilizing approaches ranging from molecular biology to integrative physiology.

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all Authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

It is essential to give a fax number and e-mail address when submitting a manuscript.

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

**Authors are encouraged to submit video material or animation sequences** to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

#### *Fast processing option*

If your article has previously been rejected from another journal, the Editors can process your submission to *Vascular Pharmacology* more quickly if the previously received reviewer's comments are made available to them. Please note that these will have to be sent (by email) by the Editor(s) of the respective other journal, we do not accept reviewer's comments submitted from the authors themselves. For questions please contact [vph@elsevier.com](mailto:vph@elsevier.com).

#### *Types of paper*

The Journal publishes invited reviews and regular research articles. Sponsored supplements and special issues of collections of papers on the same subject are also published, and can be arranged through negotiation with the Editor.

#### **Author Checklist for Research Manuscripts**

Authors, before submission of their manuscript to *Vascular Pharmacology*, and Reviewers who handle manuscripts for *Vascular Pharmacology*, should consider this [checklist](#). The list is designed to encourage best practice in publication. Failure to take account of any item on this list of relevance to the submitted manuscript is likely to lead to requests for revision of the work or, at worst, rejection.

### BEFORE YOU BEGIN

#### *Ethics in publishing*

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

#### *Human and animal rights*

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving

humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: [http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/supporthub/publishing](http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

**Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

**Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

**Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

**Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

**Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf (e.g. by their research funder or institution).

**Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

*Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

**Green open access**

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

### **Elsevier Publishing Campus**

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### **Referees**

**Please suggest 4 potential reviewers for this submission. At least 2 of the suggested reviewers should be located in the USA or Europe.**

## **PREPARATION**

### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

### **REVISED SUBMISSIONS**

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

#### **Article structure**

##### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

##### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

##### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

##### *Results*

Results should be clear and concise.

##### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

##### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

##### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

The abstract should have 100-200 words.

#### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image

with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Keywords**

*Keywords.* Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Chemical compounds**

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <https://www.elsevier.com/PubChem>.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.



## Artwork

### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

#### Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

## Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

## References

### Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/vascular-pharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### *Reference style*

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

#### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

#### **Supplementary material**

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

#### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

#### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

##### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address

- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

## **AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.