

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM UM MODELO ANIMAL DE HIPERTROFIA
MAL ADAPTATIVA DE VENTRÍCULO DIREITO**

Fernanda Severo Curuja

Porto Alegre, Dezembro de 2018.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**INFILTRAÇÃO DE MACRÓFAGOS EM UM MODELO ANIMAL DE HIPERTROFIA
MAL ADAPTATIVA DE VENTRÍCULO DIREITO**

Fernanda Severo Curuja

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo

Coorientador: Dr. Michael Andrades

Porto Alegre, Dezembro de 2018.

Aos meus pais e avós, por sempre estarem ao meu lado...

*“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita
Torna-se realidade.”*

Buda

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de parabenizar minha família e amigos, pois essa conquista é tão deles quanto minha.

Agradeço especialmente a minha primeira professora, minha referência de vida, minha mãe, Sandra. Uma mulher com uma força e fé inacreditáveis, que me ensinou educação, valores, respeito e muito amor. Ao meu pai, Fernando, por ser a pessoa mais inteligente que eu conheço, por estar sempre do meu lado, me apoiando e me amando. Aos meus avós, Abelardo e Santa, pois sem vocês eu não teria chegado tão longe. Ao meu irmão Gabriel, por todos os momentos de risos e “brotheragem”. E ah, pelas ótimas revisões dos meus trabalhos (inclusive esta). Aos meus dindos, Karen e Paulinho, meus tios, principalmente a Preta, por todas as dicas, meus primos e família, vocês são demais. Obrigada Keyla por ser a prima mais querida.

Serei eternamente agradecida a todos os meus amigos, aqueles que observaram de longe, aqueles que acompanharam de perto e aqueles que estiveram ao meu lado, trilhando o mesmo caminho. Ao Natan por me proporcionar os meios necessários para escrever esse trabalho. Obrigada por serem meu suporte diário: Ariadne e principalmente Bianca, por toda a amizade e corações partidos. Agradeço especialmente aos meus amigos e colegas Andressa, Geórgia, Larissa, Luiza, Marina, Natália e Victor, vocês tornaram isso menos desgastante e mais divertido.

Agradeço ao Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do HCPA, por terem me acolhido da melhor forma durante 4 anos. Todos os aprendizados, experiências e amizades foram responsáveis pela minha evolução pessoal e profissional. Ao Daniel e Mariana, por me aguentarem diariamente. Um obrigado especial à Daiane, por ser a melhor pesquisadora que eu conheço. Ainda, e não menos importante, meu orientador Michael, por toda a dedicação, ensinamentos e paciência diária. Ao prof. Alex Sander, por aceitar fazer parte desse projeto.

Por fim, obrigada ao meu melhor amigo, companheiro e namorado Jaidson, tu sempre foi e sempre será o principal responsável por essa conquista, obrigada por ser a base, minha estrutura durante todos esses anos, por todo o carinho e apreço para com os meus estudos, essa vitória é mais tua do que minha.

RESUMO

O ventrículo direito (VD) vem se destacando na comunidade médica e científica, uma vez que alteração na sua função está relacionada à demonstração do valor prognóstico nas doenças cardiovasculares. A monocrotalina (MCT) é utilizada para indução de hipertensão pulmonar em roedores, nos quais a hipertrofia mal adaptativa é observada em cerca de duas a três semanas. Neste cenário, a inflamação é reconhecida como colaboradora na progressão da hipertrofia para insuficiência cardíaca direita (ICD); assim, indicando uma possível importância dos macrófagos neste cenário. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a infiltração de macrófagos no VD de ratos machos *Wistar*, assim como sua associação com o remodelamento tecidual causado pela injeção intraperitoneal de MCT após 15 dias. Para indução da hipertrofia adaptativa do VD, a MCT foi administrada em dose única intraperitoneal (60mg/kg) em ratos *Wistar* machos adultos. Aos animais do grupo controle foi administrada uma injeção única de veículo correspondente ao peso. Ao final da indução, os ratos foram submetidos à ecocardiografia e encaminhados à eutanásia, o coração foi removido, dissecado, o VD foi pesado e encaminhado para análises. O fenótipo dos macrófagos foi determinado por PCR em tempo real com sonda para macrófagos totais (*Cd68*) normalizadas com *Actb*. O peso do VD teve um aumento de 14% no grupo MCT comparado com o grupo CT. A pressão média da artéria pulmonar aumentou 76% no grupo MCT em comparação com o grupo CT. Apesar da hipertrofia tecidual, não se observou um aumento na infiltração de macrófagos totais no grupo MCT. A partir desses resultados, foi possível observar que o modelo de hipertrofia do VD em ratos induzida por MCT, nesta janela temporal, foi adequado para o desenvolvimento de disfunção ventricular direita, porém não foi possível detectar uma infiltração de macrófagos totais no VD de ratos tratados com MCT quando comparados ao grupo CT.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA - DNA complementar

Cq - Ciclo de quantificação

CT - Controle

HP - Hipertensão pulmonar

ICD - Insuficiência cardíaca direita

M1 - Macrófago subtipo 1

M2 - Macrófago subtipo 2

MCT- Monocrotalina

PMAP - Pressão média da artéria pulmonar

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

VD - Ventrículo direito

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVO.....	12
4. METODOLOGIA.....	13
1. Delineamento.....	13
2. Análises morfológicas e ecocardiográficas.....	13
3. Coleta de tecidos e acondicionamentos das amostras.....	13
4. Infiltração de macrófagos por PCR em tempo real.....	14
5. Teste estatístico.....	14
5. ÉTICA.....	14
6. RESULTADOS.....	15
1. Parâmetros ecocardiográficos, hemodinâmicos e morfométricos.....	15
2. Infiltração de macrófagos por PCR em tempo real.....	17
7. DISCUSSÃO.....	20
8. CONCLUSÃO.....	22
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

INTRODUÇÃO

O ventrículo direito (VD) cada vez mais tem recebido a devida atenção por parte da comunidade médica e científica, uma vez que sua disfunção está associada com desenvolvimento da insuficiência cardíaca direita e esquerda (Haddad et al. 2008; Julien Guihaire et al. 2015). Em contrapartida, a injúria miocárdica esquerda ou, menos frequentemente, displasia arritmogênicas do VD; doença cardíaca congênita e doença respiratória crônica, incluindo desordens vasculares pulmonares, também podem resultar em insuficiência cardíaca direita (ICD). A adaptação do VD à doença é complexa e depende de muitos fatores, tais como: o tipo e a severidade da injúria ou estresse miocárdico; o tempo de curso do evento (agudo ou crônico) e o momento do início do processo patológico (nascimento, infância ou idade adulta). Outros fatores relevantes podem incluir a ativação neuro-hormonal, expressão gênica alterada e o padrão do remodelamento ventricular.

A principal causa da ICD são os danos vasculares nos pulmões, especialmente a hipertensão pulmonar (HP). Ao longo das últimas duas décadas, a disfunção do VD é considerada como fator determinante para os desfechos em longo prazo de pacientes com HP, sendo diretamente associada à taxa de sobrevivência e considerada mais importante do que a hemodinâmica pulmonar em si (Haddad et al. 2008). Neste sentido, estudos relatam que uma média alta das pressões do átrio direito e reduzido débito cardíaco são consistentemente associados com menor sobrevivência em pacientes com HP, adicionalmente, a HP é um fator de risco para mortalidade em transplantados cardíacos, devido à elevada taxa de falência do VD no pós-operatório (Klotz et al. 2006). Apesar de haver melhoras na administração farmacológica ao longo dos últimos anos, pacientes com HP ainda morrem de ICD (Julien Guihaire et al. 2013, 2015).

A inflamação é reconhecida como importante colaboradora na patogênese da ICD (Mathew 2010; Schermuly et al. 2011; Groth et al. 2014); e, por isso, já foi estudada nos pulmões (Hashimoto-Kataoka et al. 2015) e no tecido vascular (El Kasmi et al. 2014). Um tipo celular importante na coordenação dos processos inflamatórios é o macrófago, os quais são células do sistema imunitário inato, que

residem e se acumulam em todos os órgãos, saudáveis e doentes, e sua ocupação no tecido pode mudar em horas ou meses (Gordon e Taylor 2005; Martinez e Gordon 2014). Alguns fenótipos são prevalentemente inflamatórios, enquanto outros favorecem o reparo tecidual. Uma dicotomia tem sido proposta para ativação de macrófagos: clássica versus alternativa, também conhecida como M1 e M2, respectivamente. Apesar de essa dicotomia ser didática, um amplo número de estudos sustenta o conceito de diversidade de fenótipos intermediários entre os polos M1 e M2 (Mantovani et al. 2013; Nahrendorf e Swirski 2013). O subtipo M1 é descrito como pró-inflamatório, enquanto o subtipo M2 é anti-inflamatório. No pós-infarto, por exemplo, são essas células que irão guiar o processo de remodelamento cardíaco, a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias; assim, exercendo grande impacto sobre o processo de sobrevivência celular, cicatrização e contratilidade do cardiomiócito. O equilíbrio M1:M2 deve ser mantido, sob pena de agravamento processo de remodelamento mal adaptativo, pois tanto a ativação persistente do fenótipo pró-inflamatório, quanto do fenótipo pró-fibrótico pode ser prejudicial (Troidl et al. 2009; Hulsmans, Sam, e Nahrendorf 2016).

Como forma de compreender desenvolvimento da ICD, os modelos experimentais se fazem muito úteis. Para a avaliação do remodelamento mal-adaptativo do VD, em ratos *Wistar*, a administração de monocrotalina (MCT), um alcaloide presente em sementes de plantas leguminosas da espécie *Crotalaria spectabilis*, é bastante explorada e representativa. Os animais apresentam hipertrofia progressiva do VD dentro de aproximadamente 12 dias após uma única injeção subcutânea de MCT. A disfunção do VD leva cerca de 3-4 semanas e a severidade depende principalmente da dose administrada, variando de 30 mg/Kg a 80 mg/Kg (Hessel et al. 2009). O modelo de MCT é particularmente informativo no contexto de inflamação. Além disso, a vasoconstrição pulmonar parece ser um mecanismo importante. A MCT atua causando lesão direta nas células endoteliais com subsequente acúmulo de células mononucleares inflamatórias na parede vascular, o que finalmente induz proliferação e migração de células musculares lisas vasculares (Behringer et al. 2016).

Em contrapartida, existem modelos de hipertrofia adaptativa do VD, como a hipóxia crônica, usada comumente para induzir hipertensão pulmonar em uma ampla variedade de espécies animais. Este modelo, altamente reprodutível, leva a um significativo enrijecimento das grandes artérias pulmonares, especialmente em roedores e bezerros. Neste modelo, a hipertrofia adaptativa é observada em cerca de 2-3 semanas. Em resumo, as características desses dois modelos podem ser comparadas na tabela 1.

Tabela 1. Comparação de modelos de hipertrofia adaptativa e mal-adaptativa do ventrículo direito (adaptado de (Julien Guihaire et al. 2013)).

Modelo	Sobrecarga do VD	Remodelamento do VD	Reversibilidade da sobrecarga do VD
Hipóxia	Crônica	Adaptativa (4 semanas)	Espontaneamente
Monocrotalina (MCT)	Crônica	Mal adaptativa (3 semanas)	Após terapia específica para HP

O papel do recrutamento de macrófagos na patogênese da ICD em HP ainda é incerto. Em um estudo realizado com camundongos submetidos à hipóxia foi possível observar que camundongos deficientes em óxido nítrico endotelial (eNOS^{-/-}) apresentaram aumento na infiltração de macrófagos no VD, porém, naqueles resistentes à colagenase (ColR/R), a hipóxia não foi o suficiente para causar infiltração. Ainda, no mesmo estudo, foi possível observar o aumento de células marcadas com CD68 (macrófagos totais) positivas na parede do VD quando comparado ao controle (Nergui et al. 2014).

A infiltração de macrófagos em VD utilizando modelo de HP já foi demonstrada em estudo experimental com ratos tratados com sumatinib (J. Guihaire et al. 2017). Entretanto, se faz necessária a observação do tipo de macrófagos e seu papel específico no remodelamento do VD e no desenvolvimento da disfunção ventricular.

JUSTIFICATIVA

O papel dos macrófagos sobre o miocárdio do ventrículo direito ainda é desconhecido e os mecanismos envolvidos na transição da hipertrofia adaptativa para ao remodelamento mal adaptativo são de grande interesse, porém ainda pouco compreendidos. A compreensão sobre a infiltração de macrófagos na hipertrofia do VD possibilitará o entendimento do mecanismo fisiopatológico da ICD, o que, futuramente, pode vir a ser utilizado para o desenvolvimento de fármacos específicos para a doença.

OBJETIVO

Avaliar a infiltração de macrófagos no VD de ratos machos *Wistar* e a sua correlação com o remodelamento tecidual 15 dias após injeção intraperitoneal de monocrotalina.

METODOLOGIA

Delineamento

Para a avaliação da infiltração de macrófagos, 16 amostras de VD de ratos foram obtidos pela parceria com o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS.

O estudo experimental, caso-controle, foi realizado utilizando-se ratos machos *Wistar* com 45 dias de vida e peso corporal de aproximadamente 180 gramas, divididos em dois grupos: grupo tratado com monocrotalina 15 dias (MCT n=8) e o grupo controle 15 dias (CT n=8).

O experimento para a indução de insuficiência cardíaca deu-se da seguinte maneira: ratos machos *Wistar* foram tratados monocrotalina com dose única intraperitoneal de 60 mg/Kg (aproximadamente 320 µL) (Ludke et al. 2010). Para o preparo da monocrotalina, os ratos foram pesados, determinando-se a quantidade exata para cada animal e após se dissolveu a monocrotalina em HCl 0,1 M (pH 7,4) em concentração de 30 mg/mL. Os ratos dos grupos controle receberam dose única de veículo compatível com o seu peso. A mortalidade esperada neste modelo era de 25% (Souza-Rabbo et al. 2008; Correia-Pinto et al. 2009).

Análises morfológicas e ecocardiográficas

Antes da eutanásia, os animais foram pesados e posteriormente anestesiados para realização da ecocardiografia. As imagens foram obtidas com o auxílio do Ultrassom Philips HD7 com o transdutor S12-4.

Coleta de tecidos e acondicionamento das amostras

Após o tempo estipulado (15 dias) os animais foram eutanasiados e os corações coletados, os VD separados, pesados e acondicionados de maneira adequada em nitrogênio líquido até o final de todas as coletas. Por fim, o material foi congelado em freezer -80°C até a realização da análise.

Infiltração de macrófagos por PCR em tempo real

O RNA total foi extraído das amostras de VD usando o método de fenol/clorofórmio conforme recomendações do fabricante (Life Technologies).

Após, os RNAs extraídos foram analisados para avaliação da concentração no equipamento Nanodrop. Para a realização do PCR em tempo real, 2 µg de RNA extraído foi utilizado para a síntese de cDNA usando o kit de transcrição High Capacity® (Applied Biosystems/ Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

A reação de PCR em tempo real foi realizada usando Master Mix® e sonda TaqMan® (ambos da Applied Biosystems) para *Cd68* (macrófagos totais). O experimento seguiu as recomendações do fabricante e foi executado em triplicada (variações do Cq superiores à 0,26 foram excluídas). A média do Cq do gene alvo foi normalizado pela média do Cq do gene normalizador (*Actb*) (ΔCq), que foi usado como expoente na fórmula $2^{-\Delta Cq}$. Os valores foram agrupados por média geométrica.

Teste estatístico

Para análise estatística o test T de Student não pareado com correção de Welch's foi realizado com auxílio do Software GraphPrism. Por fim, os dados foram expressos em média e desvio padrão, sendo média geométrica + 95% de intervalo de confiança para os dados de PCR em tempo real, e média aritmética para os demais resultados. Valores considerados significativamente diferentes para $P < 0,05$.

ÉTICA

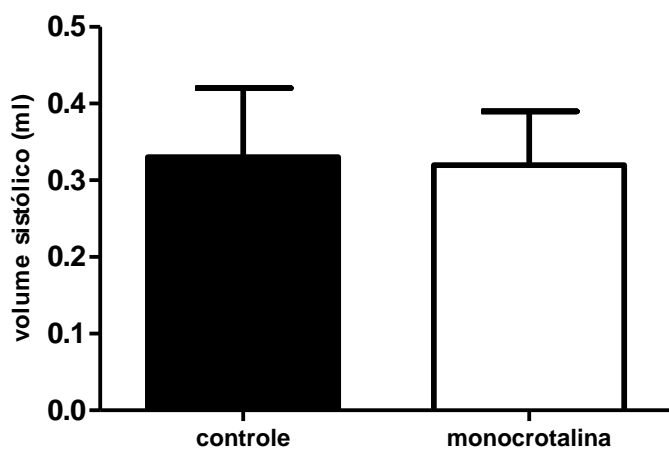
O projeto foi aprovado pela CEUA/UFRGS sob o número 26270 e conduzido considerando toda a legislação vigente, especialmente a Lei 11.794/2008 (Lei Arouca).

RESULTADOS

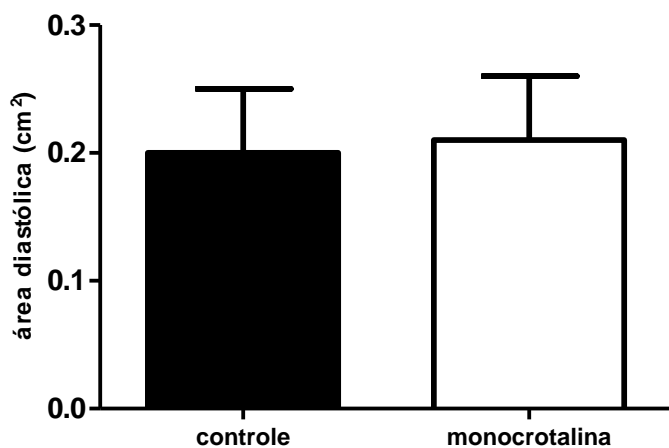
Parâmetros ecocardiográficos, hemodinâmicos e morfométricos

A indução de hipertensão pulmonar foi observada pelo aumento da PMAP, assim como a elevação do peso do ventrículo direito nos animais submetidos à administração de dose única de monocrotalina ($P < 0,05$). Os dados não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

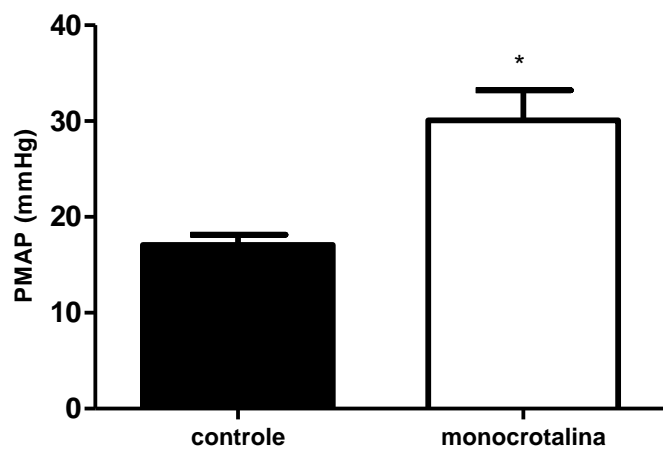
(A)



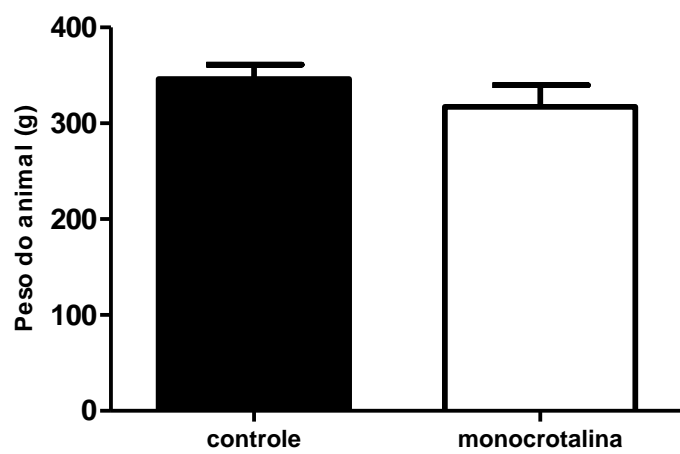
(B)



(C)



(D)



(E)

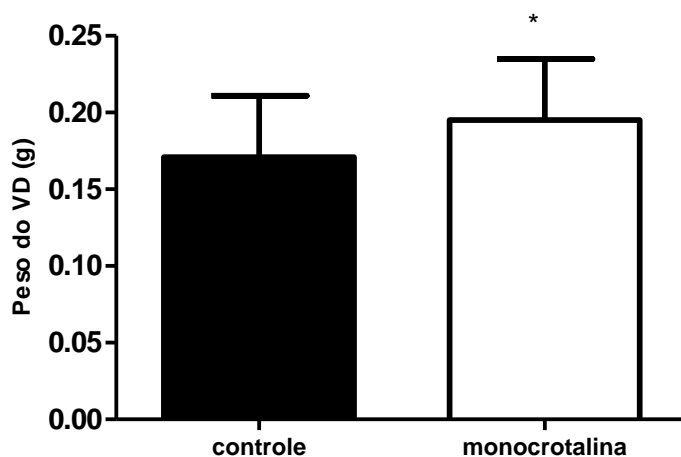


Imagem 1: Parâmetros ecocardiográficos, hemodinâmico e morfométricos do ventrículo direito (VD). (A) volume sistólico; (B) área diastólica; (C) pressão média da artéria pulmonar (PMAP); (D) peso do animal; (E) peso do VD. Valores expressos como média \pm DP (n=7), Análise realizada pelo software GraphPad Prism * representa diferença significativa com relação ao controle P < 0,05.

Infiltração de macrófagos por PCR em tempo real

Para o cálculo da média os valores dos Cq foram verificados considerando até 20% de diferença entre as triplicatas. O valor de expressão gênica média do gene alvo (Cq *Cd68*) foi normalizado pelo valor médio do gene normalizador *Actb* (ΔCq), posteriormente, cada valor foi aplicado na fórmula: $2^{-\Delta Cq}$ e por último calculou-se a média geométrica tanto do grupo CT quanto do grupo MCT. Os valores das 16 amostras estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2. Amostras com seus respectivos valores das médias dos Cqs e cálculos referente ao qPCR.

Grupo Controle (CT)	Cqm <i>Actb</i>	Cqm <i>Cd68</i>	ΔCq	$2^{-\Delta Cq}$
CT1	22,388	28,006	5,617	0,020
CT4	21,171	27,224	6,053	0,015
CT5	21,029	27,359	6,330	0,012
CT6	22,391	27,373	4,982	0,032
CT7	23,685	28,754	5,068	0,030
CT8	22,164	28,610	6,447	0,011
CT9	22,610	28,718	6,108	0,014
CT10	23,251	29,131	5,881	0,017
Grupo Monocrotalina (MCT)	Cqm <i>Actb</i>	Cqm <i>Cd68</i>	ΔCq	$2^{-\Delta Cq}$
MCT1	20,481	26,537	6,057	0,015
MCT5	22,049	27,345	5,296	0,025
MCT6	20,571	26,800	6,229	0,013
MCT7	21,571	27,133	5,562	0,021
MCT8	22,141	27,760	5,619	0,020
MCT9	24,046	29,599	5,553	0,021
MCT10	23,606	28,662	5,057	0,030
MCT11	23,639	29,906	6,267	0,013

Os valores de $2^{-\Delta Cq}$ foram utilizados para obter o gráfico representado na figura a seguir (Imagem 2). Os dados foram dispostos no software GraphPad Prism versão 5 como média geométrica + intervalo de confiança de 95%.

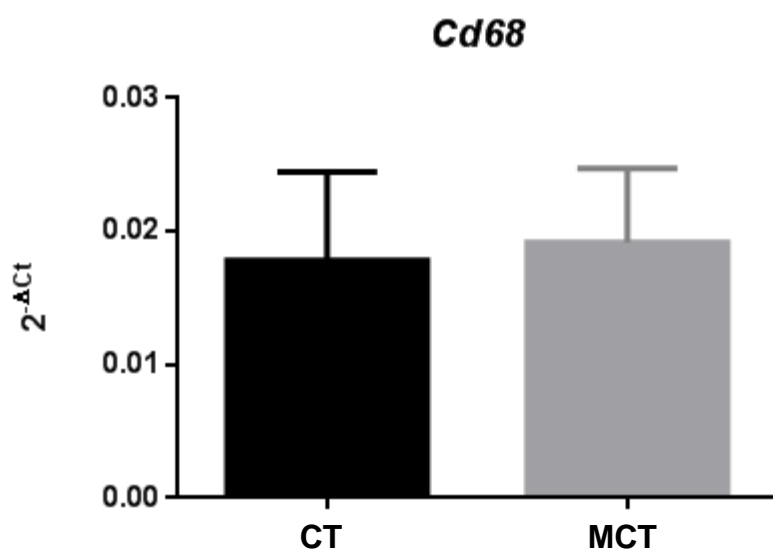


Imagem 2: Expressão gênica de macrófagos em VD por técnica de qPCR. CT - controle, MCT - monocrotalina, *Cd68* – macrófagos totais. Dados expressos como média geométrica + intervalo de confiança 95%. Análise realizada pelo software GraphPad Prism. $p=0,79$.

O resultado da avaliação da expressão gênica de *Cd68* indica que não há diferença na infiltração de macrófagos de amostras de Vd de ratos tratados do grupo MCT quando comparados ao grupo CT.

DISCUSSÃO

De acordo com os dados hemodinâmicos foi possível observar que houve indução de HP pela administração de MCT, verificada pelo aumento da pressão média da artéria pulmonar. Além disso, ao analisarmos os dados morfométricos, nota-se que houve hipertrofia pelo aumento da massa do VD. Contudo, os dados da expressão gênica demonstram que não há aumento na infiltração de macrófagos no grupo MCT neste período de remodelamento ventricular.

A infiltração de macrófagos no VD já foi demonstrada em diversos estudos, em modelos com embolia pulmonar, tanto em humanos (Iwadate et al. 2003), quanto em ratos (Watts et al. 2006, 2009), em modelos animais de indução de HP com sumatinib (J. Guilhaire et al. 2017), ICD desencadeada por bandagem arterial pulmonar em ratos (Yoshida et al. 2016) e inclusive em animais com HP (Nergui et al. 2014).

Por outro lado, o modelo de indução de HP por MCT leva ao remodelamento da vasculatura pulmonar e o desenvolvimento da HP durante um período aproximadamente de 14 dias, provocando o estabelecimento da hipertrofia do ventrículo direito. Além disso, é possível observar alterações relevantes nos dados morfométricos, tal como aumento da massa do VD, em animais submetidos à administração da MCT (Türk et al. 2018). Outro estudo já havia demonstrado hipertrofia do VD em modelo de MCT em períodos mais longos de tempo (Huang et al. 2016).

Porém, nenhum estudo explorou a polarização dos macrófagos no miocárdio do VD em modelos de HP. Neste sentido, explorar perfil dos macrófagos e seu papel específico no remodelamento do VD e no desenvolvimento da ICD é necessário. O subtipo M1 é descrito como relacionado ao perfil pró-inflamatório, enquanto o subtipo M2, anti-inflamatório. Um balanço entre os polos seria o ideal para evitar o agravamento do remodelamento do VD (Troidl et al. 2009; Hulsmans, Sam, e Nahrendorf 2016). Com isso, mesmo não se observando um aumento total de macrófagos pelo perfil gênico, uma análise da dos subtipos poderia demonstrar um desequilíbrio entre M1 e M2.

Contudo, é necessário que se faça uma discussão sobre o momento da análise e sobre a metodologia utilizada para avaliar a presença de macrófagos (qPCR). É possível que a falta de infiltração no grupo MCT se deva ao fato de que o processo inflamatório ainda não está estabelecido neste modelo. Outros processos, como estresse oxidativo, também não se apresentam consistentemente elevados neste momento da doença (Türck et al. 2018) e mesmo o remodelamento tecidual pode piorar até 31 dias de seguimento (Leichsenring-Silva et al. 2011). Por outro lado, é importante avaliar se a técnica utilizada neste trabalho é capaz de medir adequadamente o processo de infiltração de macrófagos. A avaliação histológica com anticorpos anti-CD68 é amplamente empregada para tecidos de ratos. É possível identificar a célula, a sua posição, e quantificá-la em diversos campos do tecido. Porém, a expressão gênica de CD68 tem se mostrado correlata à contagem histológica em diversos tecidos (Morgan-Bathke et al. 2017; Di Gregorio et al. 2005) e, portanto, mostra-se como uma técnica confiável. Porém, pretendemos executar análises histológicas em trabalhos futuros para validar os nossos resultados.

Em pacientes com HP, a disfunção sistólica do VD prediz o desfecho adverso independentemente de alterações na resistência vascular pulmonar. Embora as intervenções terapêuticas na HP estejam focadas na vasculatura pulmonar, a sobrevivência está significativamente associada à melhora da função ventricular direita, enquanto resistência vascular pulmonar tem pouca relação com o desfecho (Frangogiannis 2017). Sendo assim, pela importância que o VD tem no aspecto da HP, faz-se necessário um aprofundamento do perfil inflamatório no desenvolvimento da ICD, tanto em análises histológicas quanto em expressão gênica, avaliar também a polarização dos macrófagos no VD, além de fibrose e por último a análise de citocinas relacionadas com os processos descritos acima.

CONCLUSÃO

A partir da análise da expressão gênica de *Cd68*, não foi possível observar uma infiltração de macrófagos totais no VD de ratos tratados com MCT quando comparados ao grupo CT. Porém, a avaliação da polarização, da fibrose e citocinas relacionadas são de fundamental interesse para compreensão tanto do desenvolvimento quanto do estabelecimento da ICD desencadeada por HP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Behringer, Arnica, Manuela Trappiel, Eva Maria Berghausen, Henrik Ten Freyhaus, Ernst Wellnhofer, Margarete Odenthal, Florian Blaschke, et al. 2016. "Pioglitazone Alleviates Cardiac and Vascular Remodelling and Improves Survival in Monocrotaline Induced Pulmonary Arterial Hypertension". *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389 (4): 369–79.
- Correia-Pinto, Jorge, Tiago Henriques-Coelho, Roberto Roncon-Albuquerque Jr, André P. Lourenço, Gustavo Melo-Rocha, Francisco Vasques-Nóvoa, Thierry C. Gillebert, e Adelino F. Leite-Moreira. 2009. "Time Course and Mechanisms of Left Ventricular Systolic and Diastolic Dysfunction in Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension". *Basic Research in Cardiology* 104 (5): 535–45.
- Di Gregorio, Gina B., Aiwei Yao-Borengasser, Neda Rasouli, Vijayalakshmi Varma, Tong Lu, Leslie M. Miles, Gouri Ranganathan, Charlotte A. Peterson, Robert E. McGehee, e Philip A. Kern. 2005. "Expression of CD68 and Macrophage Chemoattractant Protein-1 Genes in Human Adipose and Muscle Tissues: Association with Cytokine Expression, Insulin Resistance, and Reduction by Pioglitazone". *Diabetes* 54 (8): 2305–13.
- El Kasmi, Karim C., Steven C. Pugliese, Suzette R. Riddle, Jens M. Poth, Aimee L. Anderson, Maria G. Frid, Min Li, et al. 2014. "Adventitial Fibroblasts Induce a Distinct Proinflammatory/profibrotic Macrophage Phenotype in Pulmonary Hypertension". *Journal of Immunology* 193 (2): 597–609.
- Frangogiannis, Nikolaos G. 2017. "Fibroblasts and the Extracellular Matrix in Right Ventricular Disease". *Cardiovascular Research* 113 (12): 1453–64.
- Gordon, Siamon, e Philip R. Taylor. 2005. "Monocyte and Macrophage Heterogeneity". *Nature Reviews. Immunology* 5 (12): 953–64.
- Groth, Alexandra, Bart Vrugt, Matthias Brock, Rudolf Speich, Silvia Ulrich, e Lars C. Huber. 2014. "Inflammatory Cytokines in Pulmonary Hypertension". *Respiratory Research* 15 (abril): 47.
- Guihaire, J., T. Deuse, D. Wang, E. Fadel, H. Reichenspurner, R. C. Robbins, e S. Schrepfer. 2017. "(1138) - Pulmonary Hypertension: Macrophage Infiltration Correlates with Right Ventricular Remodeling in an Experimental Model of Pulmonary Hypertension". *The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 36 (4, Supplement): S370–71.
- Guihaire, Julien, Harm Jan Bogaard, Erwan Flécher, Pierre-Emmanuel Noly, Olaf Mercier, François Haddad, e Elie Fadel. 2013. "Experimental Models of Right Heart Failure: A Window for Translational Research in Pulmonary Hypertension". *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 34 (5): 689–99.
- Guihaire, Julien, Pierre Emmanuel Noly, Sonja Schrepfer, e Olaf Mercier. 2015. "Advancing Knowledge of Right Ventricular Pathophysiology in Chronic Pressure Overload: Insights from Experimental Studies". *Archives of Cardiovascular Diseases* 108 (10): 519–29.
- Haddad, François, Ramona Doyle, Daniel J. Murphy, e Sharon A. Hunt. 2008. "Right Ventricular Function in Cardiovascular Disease, Part II: Pathophysiology, Clinical

- Importance, and Management of Right Ventricular Failure". *Circulation* 117 (13): 1717–31.
- Hashimoto-Kataoka, Takahiro, Naoki Hosen, Takashi Sonobe, Yoh Arita, Taku Yasui, Takeshi Masaki, Masato Minami, et al. 2015. "Interleukin-6/interleukin-21 Signaling Axis Is Critical in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (20): E2677–86.
- Hessel, Marleen, Paul Steendijk, Brigit den Adel, Cindy Schutte, e Arnoud van der Laarse. 2009. "Pressure Overload-Induced Right Ventricular Failure Is Associated with Re-Expression of Myocardial Tenascin-C and Elevated Plasma Tenascin-C Levels". *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 24 (3-4): 201–10.
- Huang, Zhiwei, Zhihong Liu, Qin Luo, Zhihui Zhao, Qing Zhao, Yaguo Zheng, Qunying Xi, e Yi Tang. 2016. "Glycoprotein 130 Inhibitor Ameliorates Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats". *The Canadian Journal of Cardiology* 32 (11): 1356.e1–1356.e10.
- Hulsmans, Maarten, Flora Sam, e Matthias Nahrendorf. 2016. "Monocyte and Macrophage Contributions to Cardiac Remodeling". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 93 (abril): 149–55.
- Iwadate, Kimiharu, Mikio Doi, Kozo Tanno, Seiko Katsumura, Haruo Ito, Keita Sato, Isamu Yonemura, e Yohko Ito. 2003. "Right Ventricular Damage due to Pulmonary Embolism: Examination of the Number of Infiltrating Macrophages". *Forensic Science International* 134 (2-3): 147–53.
- Klotz, Stefan, Frauke Wenzelburger, Joerg Stypmann, Henryk Welp, Gabriele Drees, Christof Schmid, e Hans H. Scheld. 2006. "Reversible Pulmonary Hypertension in Heart Transplant Candidates: To Transplant or Not to Transplant". *The Annals of Thoracic Surgery* 82 (5): 1770–73.
- Leichsenring-Silva, Fabiano, Angela Maria Vicente Tavares, Francisca Mosele, Bruno Berger, Susana Llesuy, e Adriane Belló-Klein. 2011. "Association of the Time Course of Pulmonary Arterial Hypertension with Changes in Oxidative Stress in the Left Ventricle". *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 38 (12): 804–10.
- Ludke, Ana R. L., Francisca Mosele, Rafaela Caron-Lienert, Maria Flávia Ribeiro, Wânia Partata, Susana Llesuy, Alex Sander Araujo, Pawan Singal, e Adriane Belló-Klein. 2010. "Modulation of Monocrotaline-Induced Cor Pulmonale by Grape Juice". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 55 (1): 89–95.
- Mantovani, Alberto, Subhra K. Biswas, Maria Rosaria Galdiero, Antonio Sica, e Massimo Locati. 2013. "Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and Remodelling". *The Journal of Pathology* 229 (2): 176–85.
- Martinez, Fernando O., e Siamon Gordon. 2014. "The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment". *F1000prime Reports* 6 (março): 13.
- Mathew, Rajamma. 2010. "Inflammation and Pulmonary Hypertension". *Cardiology in Review* 18 (2): 67–72.
- Morgan-Bathke, Maria, Debra Harteneck, Philippa Jaeger, Esben Sondergaard, Ron

- Karwoski, Ana Espinosa De Ycaza, B. Gisella Carranza-Leon, William A. Faubion Jr, Andre M. Oliveira, e Michael D. Jensen. 2017. "Comparison of Methods for Analyzing Human Adipose Tissue Macrophage Content". *Obesity* 25 (12): 2100–2107.
- Nahrendorf, Matthias, e Filip K. Swirski. 2013. "Monocyte and Macrophage Heterogeneity in the Heart". *Circulation Research* 112 (12): 1624–33.
- Nergui, Suvd, Yoshihiro Fukumoto, Zhulanqigige Do E, Sota Nakajima, Toru Shimizu, Shohei Ikeda, Md Elias-Al-Mamun, e Hiroaki Shimokawa. 2014. "Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Collagen Metabolism in Right Ventricular Remodeling due to Pulmonary Hypertension". *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 78 (6): 1465–74.
- Schermuly, Ralph T., Hossein A. Ghofrani, Martin R. Wilkins, e Friedrich Grimminger. 2011. "Mechanisms of Disease: Pulmonary Arterial Hypertension". *Nature Reviews. Cardiology* 8 (8): 443–55.
- Souza-Rabbo, Maristela P., Luis F. F. Silva, Jorge A. S. Auzani, Marcus Picoral, Neelam Khaper, e Adriane Belló-Klein. 2008. "Effects of a Chronic Exercise Training Protocol on Oxidative Stress and Right Ventricular Hypertrophy in Monocrotaline-Treated Rats". *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 35 (8): 944–48.
- Troidl, C., H. Möllmann, H. Nef, F. Masseli, S. Voss, S. Szardien, M. Willmer, et al. 2009. "Classically and Alternatively Activated Macrophages Contribute to Tissue Remodelling after Myocardial Infarction". *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (9B): 3485–96.
- Türck, Patrick, Denise Santos Lacerda, Cristina Campos Carraro, Bruna Gazzi de Lima-Seolin, Rayane Brinck Teixeira, Jéssica Hellen Poletto Bonetto, Rafael Colombo, Paulo Cavalheiro Schenkel, Adriane Belló-Klein, e Alex Sander da Rosa Araujo. 2018. "Trapidil Improves Hemodynamic, Echocardiographic and Redox State Parameters of Right Ventricle in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Model". *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 103 (julho): 182–90.
- Watts, John A., Michael A. Gellar, Lori K. Stuart, Maria Obratsova, e Jeffrey A. Kline. 2009. "Proinflammatory Events in Right Ventricular Damage during Pulmonary Embolism: Effects of Treatment with Ketorolac in Rats". *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 54 (3): 246–52.
- Watts, John A., John Zagorski, Michael A. Gellar, Brad G. Stevinson, e Jeffrey A. Kline. 2006. "Cardiac Inflammation Contributes to Right Ventricular Dysfunction Following Experimental Pulmonary Embolism in Rats". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41 (2): 296–307.
- Yoshida, Keimei, Kohtaro Abe, Keita Saku, e Kenji Sunagawa. 2016. "Inhibition of Nuclear Factor-kappaB-Mediated Inflammation Reverses Fibrosis and Improves RV Function in Rats with Pulmonary Artery Banding". *Journal of cardiac failure* 22 (9): S198.