



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

RAYANNE MAIRA FELIX RIBEIRO ALVES

Efeito do Carvacrol em Ratos com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina

João Pessoa – PB

2019

RAYANNE MAIRA FELIX RIBEIRO ALVES

Efeito do Carvacrol em Ratos com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina

Dissertação apresentada ao **Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas** da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

João Pessoa – PB

2019

A474e Alves, Rayanne Maira Felix Ribeiro.

Efeito do Carvacrol em Ratos com Hipertensão Pulmonar
Induzida por Monocrotalina / Rayanne Maira Felix
Ribeiro Alves. - João Pessoa, 2019.

86 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Hipertensão pulmonar. 2. Monocrotalina. 3.
Carvacrol. I. de Medeiros, Isac Almeida. II. Título.

UFPB/BC

RAYANNE MAIRA FELIX RIBEIRO ALVES

Efeito do Carvacrol em Ratos com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina

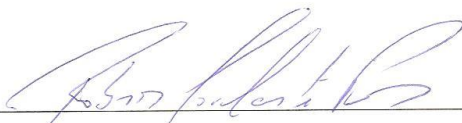
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**.

Dissertação aprovada em 26/08/2019.

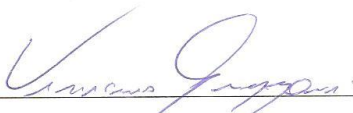
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros



Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras



Prof. Dr. Vinicius Guzzoni

*Aos meus pais,
Marcos Antônio Batista Alves (in memoriam) e
Lilian Felix Ribeiro Alves
e à minha tia Maisa Felix Ribeiro de Araújo, dedico.*

Agradecimientos

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao meu Pai Celestial e a Seu Filho Jesus Cristo, pela bênção de ter me concedido realizar o mestrado, pela força que precisei para suportar os momentos difíceis, por Terem trilhado este caminho junto a mim.

À minha mãe, Lilian Felix Ribeiro Alves, por ter me acompanhado em todo o decorrer do curso, estando comigo nos bons e maus momentos, me encorajando, incentivando.

À minha tia-mãe, Maisa Felix Ribeiro de Araújo, pelo apoio, carinho, por acreditar em meu potencial.

Aos meus avós maternos João Ribeiro de Araújo e Maria Felix Ribeiro de Araújo, assim como a minha irmã Rhaissa e seu esposo Lucas Bittencourt pelo apoio e auxílio. E também a todos os meus familiares de forma geral pelo incentivo.

Aos queridos Dr. Lauro Wanderley Filho e a Dra. Janaína D'Emery pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao meu orientador, professor dr. Isac Almeida de Medeiros, por ter me dado a oportunidade de pertencer ao seu laboratório e desenvolver esta pesquisa, obrigada pela orientação.

À professora Thaís Porto, pelo auxílio na construção e desenvolvimento da pesquisa.

À Fátima Azevedo pelo auxílio em todo o decorrer dos experimentos.

Aos meus queridos amigos Júlio César, Pablo, Gessyca e Aline.

À Priscilla Maciel, Tays Amanda, Bárbara e Luciana, por tirarem minhas dúvidas e auxiliarem na pesquisa.

A todos os colegas de trabalho no laboratório e também aos professores doutores Robson Veras, Islânia Gisélia, Giciane Vieira e também a querida D. Maria.

A Crispim por me ensinar em como proceder no manejo dos animais e estar sempre pronto a ajudar.

A todos os colegas e professores do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e em especial, ao coordenador do curso, professor dr. Ian Amaral.

Aos professores doutores Robson Veras, Vinícius Guzzoni e Demétrius de Araújo por terem aceitado o convite para participar da banca examinadora e contribuir com o trabalho.

À CAPES e FAPESQ pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

“Continue a tentar. Continue a confiar. Continue a acreditar. Continue a crescer. Os céus estão regozijando por você hoje, amanhã e para sempre”.

– Élder Jeffrey R. Holland

Resumo

Resumo

Hipertensão pulmonar (HP) é caracterizada pelo aumento no tônus vascular pulmonar, que acarreta na elevação da pressão arterial pulmonar (PAP), insuficiência ventricular direita e morte. O carvacrol (CRV) é um monoterpene fenólico presente em algumas plantas aromáticas e apresenta propriedades importantes como a atividade vasorelaxante, anti-inflamatória, antibacteriana e antitumoral. Diante disto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do carvacrol no tratamento de ratos com HP induzida pela monocrotalina. Para o desenvolvimento deste estudo, ratos Wistar receberam injeção subcutânea com salina 0,9% (grupo controle - CTL) ou monocrotalina (60 mg/Kg) para indução da HP. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: CTL; MCT; MCT+CRV 50mg/Kg; MCT+CRV 100mg/Kg; e MCT+SILD (sildenafil 50mg/Kg). Após 24 horas, os ratos foram tratados diariamente por administração oral durante 28 dias. Os seguintes parâmetros foram avaliados: pressão arterial pulmonar (PAP), razão entre o peso do ventrículo direito sobre o peso do ventrículo esquerdo e septo (índice de Fulton), reatividade vascular, remodelamento vascular pulmonar e produção de ânions superóxido. A aferição da PAP mostrou que o grupo MCT (37 ± 3 mmHg; $n = 4$) apresentou aumento na pressão sistólica ventricular direita quando comparado ao grupo CTL (20 ± 2 mmHg; $n = 4$). Os grupos MCT+CRV 50mg/Kg (24 ± 1 mmHg; $n = 4$) e MCT+SILD (21 ± 4 mmHg; $n = 4$) atenuaram significativamente a pressão. Quanto ao índice da hipertrofia ventricular direita o grupo MCT ($0,38 \pm 0,02$ g; $n = 4$) mostrou um aumento quando comparado ao grupo CTL ($0,23 \pm 0,04$ g; $n = 4$). Os grupos MCT+CRV 50mg/Kg ($0,26 \pm 0,02$ g; $n = 4$) e MCT+CRV 100mg/Kg ($0,26 \pm 0,05$ g; $n = 4$) reduziram significativamente a hipertrofia ventricular direita. A análise de reatividade vascular mostrou que as contrações frente fenilefrina (FEN), assim como, vasodilatação frente acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato de sódio (NPS) foram significativamente reduzidas ($E_{\text{máx}} = 66 \pm 5\%$; $n = 6$, $E_{\text{máx}} = 44 \pm 8\%$; $n = 6$, ou $E_{\text{máx}} = 78 \pm 3\%$; $n = 8$, respectivamente) no grupo MCT quando comparado ao grupo CTL. Por outro lado, o tratamento com CRV (MCT+CRV 50 mg/kg ou MCT+CRV 100 mg/kg) melhoraram significativamente as contrações frente FEN ($E_{\text{máx}} = 98 \pm 9\%$; $n = 6$, ou $E_{\text{máx}} = 88 \pm 8\%$; $n = 6$, respectivamente) ou vasodilatação frente ACh ($E_{\text{máx}} = 75 \pm 8\%$; $n = 7$, ou $E_{\text{máx}} = 130 \pm 13\%$; $n = 5$, respectivamente). Contudo, alterações significativas não foram observadas ao NPS, com exceção do grupo MCT+CRV 50mg/kg ($E_{\text{máx}} = 90 \pm 2\%$; $n = 8$), que demonstrou melhora a vasodilatação frente NPS. As análises histológicas da parede da artéria pulmonar demonstraram que o grupo MCT ($310 \pm 5,2\%$; $n = 5$) apresentou espessamento da parede do vaso, com aumento significativo de células musculares lisas quando comparados ao grupo CTL ($100 \pm 5,2\%$; $n = 5$). Os grupos MCT+CRV 100mg/Kg ($147 \pm 10,5\%$; $n = 5$) e MCT+SILD ($94 \pm 10,5\%$; $n = 5$) atenuaram a proliferação de células musculares lisas. Quanto à análise de estresse oxidativo nos tecidos das artérias pulmonares, foi observado que o grupo MCT ($216 \pm 22\%$; $n = 5$) apresentou elevada porcentagem de fluorescência, quando comparados ao grupo CTL ($100 \pm 6\%$; $n = 5$). Os grupos MCT+CRV 50mg/Kg ($119 \pm 8\%$; $n = 5$); MCT+CRV 100mg/Kg ($68 \pm 6\%$; $n = 5$) e MCT+SILD ($96 \pm 7\%$; $n = 5$) atenuaram este estresse oxidativo. Estes resultados demonstram que o modelo escolhido para indução da HP, a monocrotalina, é eficaz ao levar as alterações estruturais e funcionais da artéria pulmonar, gerando alterações fisiológicas semelhantes ao que ocorre em humanos, ademais, o carvacrol mostrou ser uma substância promissora para o tratamento da HP visto que, atenua a pressão arterial pulmonar, hipertrofia ventricular direita, remodelamento vascular pulmonar, melhora a disfunção endotelial, e reduz o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Hipertensão pulmonar; monocrotalina; carvacrol.

Abstract

Abstract

Pulmonary hypertension (PH) is characterized by an increase in pulmonary vascular tone, which leads to elevated pulmonary artery pressure, right ventricular failure and death. The carvacrol (CRV) is a phenolic monoterpene present in some aromatic plants, and its contain important properties such as vasorelaxant, anti-inflammatory, antibacterial and anti-tumor activity. The aim of this study was to evaluate the effects of carvacrol in treatment monocrotaline (MCT)-induced PH in rats. For the development of this study, male Wistar rats were injected subcutaneously with saline 0,9% (control group - CTL) or monocrotaline (60mg/Kg) to develop PH. They were divided into the following groups: CTL; MCT; MCT+CRV 50mg/Kg; MCT+CRV 100mg/Kg; and MCT+SILD (sildenafil 50mg/Kg). 24 hours later, rats were treated daily with oral administration for 28 days. The following parameters were evaluated: pulmonary artery pressure (PAP), right ventricular weight to left ventricular plus septum weight ratio (Fulton index), vascular reactivity, pulmonary vascular remodeling and production of superoxide anions. The measurement of PAP showed that the MCT group (37 ± 3 mmHg; $n = 4$) presented increased right ventricular systolic pressure, compared to the CTL group (20 ± 2 mmHg; $n = 4$). The MCT+CRV 50mg/Kg (24 ± 1 mmHg; $n = 4$) and MCT+SILD (21 ± 4 mmHg; $n = 4$) groups significantly attenuated the pressure. Regarding to index of right ventricular hypertrophy the MCT group ($0,38 \pm 0,02$ g; $n = 4$) showed an elevated compared to the CTL group ($0,23 \pm 0,04$ g; $n = 4$). The MCT+CRV 50mg/Kg ($0,26 \pm 0,02$ g; $n = 4$) and MCT+CRV 100mg/Kg ($0,26 \pm 0,05$ g; $n = 4$) groups significantly reduced the right ventricular hypertrophy. The vascular reactivity analysis showed that the contractions to phenylephrine (Phe) as well as vasodilation to acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP) were significantly reduced ($E_{\max} = 66 \pm 5\%$; $n = 6$, $E_{\max} = 44 \pm 8\%$; $n = 6$, or $E_{\max} = 78 \pm 3\%$; $n = 8$, respectively) in the MCT group compared to CTL group. On the other hand, treatment with CRV (MCT+CRV 50 mg/kg or MCT+CRV 100 mg/kg) significantly improved contractions to Phe ($E_{\max} = 98 \pm 9\%$; $n = 6$, or $E_{\max} = 88 \pm 8\%$; $n = 6$, respectively) or vasodilations to ACh ($E_{\max} = 75 \pm 8\%$; $n = 7$, or $E_{\max} = 130 \pm 13\%$; $n = 5$, respectively). Nevertheless, no significant alterations were observed to SNP, excepting that vasodilation was improved in the MCT+CRV 50mg/kg group ($E_{\max} = 90 \pm 2\%$; $n = 8$). Histological analysis of the pulmonary artery wall showed that the MCT ($310 \pm 5,2$ %; $n = 5$) group presented thickening of the vessel wall, with a significant increase of smooth muscle cells when compared to the CTL ($100 \pm 5,2$ %; $n = 5$) group. The MCT+CRV 100mg/Kg ($147 \pm 10,5$ %; $n = 5$) and MCT+SILD ($94 \pm 10,5$ %; $n = 5$) groups attenuated the proliferation of smooth muscle cells. Regarding the analysis of oxidative stress in the tissues of the pulmonary arteries, it was observed that the MCT group ($216 \pm 22\%$; $n = 5$) presented a high percentage of fluorescence when compared to the CTL group ($100 \pm 6\%$; $n = 5$). The MCT+CRV 50mg/Kg ($119 \pm 8\%$; $n = 5$); MCT+CRV 100mg/Kg ($68 \pm 6\%$; $n = 5$) and MCT+SILD ($96 \pm 7\%$; $n = 5$) groups attenuated the oxidative stress. These results demonstrate that the model chosen for the induction of PH, monocrotaline, is effective in bringing the structural and functional alterations of the pulmonary artery, generating physiological alterations similar to that occurring in humans. In addition, the carvacrol has been shown to be a promising substance for the treatment of PH, since it attenuates pulmonary arterial pressure, right ventricular hypertrophy, pulmonary vascular remodeling, improves endothelial dysfunction, and reduces tissue oxidative stress.

Keywords: Pulmonary hypertension; monocrotaline; carvacrol.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação ilustrativa da pressão sanguínea nos diferentes leitos vasculares da circulação sistêmica e pulmonar.

Figura 2: Representação ilustrativa do sistema circulatório.

Figura 3: Representação ilustrativa das diferenças de pressões parciais de O₂ e CO₂ no sistema circulatório sistêmico e pulmonar.

Figura 4: Alterações nas camadas íntima, média e adventícia da artéria pulmonar.

Figura 5: Esquema ilustrativo do desenvolvimento da hipertrofia ventricular direita e culminante insuficiência ventricular direita.

Figura 6: Estrutura molecular da monocrotalina.

Figura 7: Estrutura molecular do carvacrol.

Figura 8: Esquema representativo do tratamento dos animais e seus respectivos grupos.

Figura 9: Representação esquemática da curva concentração-resposta de acetilcolina.

Figura 10: Representação esquemática da curva concentração-resposta de fenilefrina.

Figura 11: Representação esquemática da curva concentração-resposta de nitroprussiato de sódio.

Figura 12: Análise do remodelamento vascular pulmonar em artérias pulmonares de ratos com hipertensão pulmonar induzidos por monocrotalina.

Figura 13: Análise do estresse oxidativo em ratos com hipertensão pulmonar induzidos por monocrotalina.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição da solução de Krebs-Henseleit e Krebs-Henseleit com 80mM de KCl.

Tabela 2: Composição da solução de PBS.

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Representação gráfica da pressão sistólica ventricular direita de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Gráfico 2: Representação gráfica da pressão diastólica ventricular direita de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Gráfico 3: Representação gráfica da frequência cardíaca de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Gráfico 4: Representação gráfica da hipertrofia ventricular direita de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Gráfico 5: Representação gráfica do peso corporal dos ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Gráfico 6: Representação gráfica da curva concentração-resposta frente ACh de secções de artéria pulmonar pré-contraídas com FEN de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Gráfico 7: Representação gráfica da curva concentração-resposta frente FEN de secções de artéria pulmonar de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Gráfico 8: Representação gráfica da curva concentração-resposta frente NPS de secções de artéria pulmonar pré-contraídas com FEN de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ACh: Acetilcolina

ANOVA: Análise de variância

BPM: Batimentos por minuto

BMPR2: Proteína morfogenética óssea tipo 2

CAT: Catalase

ClO^- : Hipoclorito

CO_2 : Dióxido de carbono

CRV: Carvacrol

CPEs: Células Progenitoras Endoteliais

DHE: Di-hidroetídio

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

Emáx: Efeito máximo

ET-1: Endotelina 1

FEN: Fenilefrina

FC: Frequência Cardíaca

GPx: Glutathione peroxidase

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

.HO: Radical hidroxila

HP: Hipertensão Pulmonar

HVD: Hipertrofia Ventricular Direita

IL-1: Interleucina-1

IL-6: Interleucina-6

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

MCT: Monocrotalina

MDA: Malondialdeído

MMP: Metaloproteinase de matriz

NO: Óxido nítrico

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

NOS: Óxido Nítrico Sintase

NPS: Nitroprussiato de sódio

$O_2^{\cdot -}$: Ânion superóxido

O_2 : Oxigênio

O_3 : Ozônio

OCT: Meio Ótimo de Temperatura de Corte

OMS: Organização Mundial da Saúde

$ONOO^-$: Peroxinitrito

PDE-5: Fosfodiesterase tipo 5

PDVD: Pressão Diastólica Ventricular Direita

PSVD: Pressão Sistólica Ventricular Direita

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SNC: Sistema Nervoso Central

SOD: Superóxido dismutase

SILD: Sildenafil

$TNF-\alpha$: Fator de Necrose Tumoral alfa

TRP: Canal potencial receptor transiente

VD: Ventrículo Direito

VD/VE+S: Ventrículo Direito/Ventrículo Esquerdo + Septo

VE: Ventrículo Esquerdo

XO: Xantina oxidase

Sumário

1. Introdução	19
1.1 Considerações sobre Fisiologia Cardiovascular e Pulmonar	20
1.2 Hipertensão Pulmonar	25
1.3 Monocrotalina	31
1.4 Carvacrol	33
2. Justificativa	36
3. Objetivos	38
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos Específicos	39
4. Materiais e Métodos	40
4.1. Experimentos em Animais	41
4.2 Substâncias	42
4.3 Análise do Efeito do Carvacrol na Redução da Hipertensão Pulmonar.....	43
4.4 Análise do Índice de Hipertrofia Ventricular.....	44
4.5 Avaliação do Efeito do Carvacrol na Prevenção da Disfunção Endotelial na Hipertensão Pulmonar	44
4.6 Análise Histológica dos Anéis de Artéria Pulmonar	46
4.7 Análises Moleculares	47
4.8 Análises Estatísticas	47
5. Resultados	48
5.1 Efeito do Carvacrol Sobre a Pressão Arterial Pulmonar e Frequência Cardíaca	49
5.2 Efeito do Carvacrol sobre a Hipertrofia Ventricular Direita	51
5.3 Análise do Peso Corporal dos Modelos Experimentais	51
5.4 Efeito do Tratamento com Carvacrol Sobre a Reatividade Vascular de Anéis de Artéria Pulmonar de Ratos com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina	52
5.5 Efeito do Carvacrol no Remodelamento Vascular Pulmonar	55
5.6 Efeito do Carvacrol Sobre o Estresse Oxidativo	56
6. Discussão	58
7. Conclusão	66
8. Referências Bibliográficas	68

Introdução

1. Introdução

1.1 Considerações sobre Fisiologia Cardiovascular e Pulmonar

O sistema cardiovascular é constituído pelo coração, o qual atua como bomba propulsora para direcionar o fluxo sanguíneo; artérias e veias com suas respectivas ramificações; e o sangue. Este sistema tem a capacidade de transportar oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos, além do transporte de nutrientes, vitaminas, hormônios e células do sistema imunológico (DEVIHA et al., 2013; BERNE & LEVY, 2009).

O sistema circulatório recolhe os resíduos metabólicos e dióxido de carbono (CO_2) e os transporta para os rins e pulmões, respectivamente, onde serão excretados. Participa da manutenção da homeostasia (VALENTI et al., 2007), estando envolvido no controle das concentrações internas de substâncias dissolvidas e regulação da temperatura corporal; além de proteger o corpo contra a perda de fluídos por meio de ajustes locais no volume sanguíneo (AIRES, 2012).

O coração está localizado ventralmente no centro da cavidade torácica entre os pulmões, seu ápice é posicionado sobre o diafragma, voltado para baixo e para o lado esquerdo do corpo, enquanto que a base está atrás do osso esterno. Ele é revestido por um saco membranoso resistente denominado como pericárdio, dentro deste pericárdio contém o líquido pericárdico claro, que tem a função de lubrificar e proteger contra o atrito a superfície externa do coração; além disso o coração também é constituído pelo miocárdio, que é o músculo cardíaco responsável por promover a contração e consequentemente a ejeção do sangue para as artérias; o miocárdio é revestido por finas camadas de epitélio e tecido conjuntivo (SILVERTHORN, 2017).

O coração apresenta duas câmaras divididas pelo septo interventricular impedindo a mistura do sangue nos dois lados do coração. O lado esquerdo apresenta o átrio esquerdo e ventrículo esquerdo, que correspondem a circulação sistêmica, também chamada de circulação periférica, ou grande circulação, enquanto que o lado direito possui o átrio direito e ventrículo direito, que correspondem a circulação pulmonar. Ambos os átrios são conhecidos como fracas bombas de escova e propõem o sangue para o interior dos ventrículos, estes, por sua vez, fornecem o bombeamento principal, já que, após sua contração haverá a distribuição do sangue para os pulmões (ventrículo direito) e por todo corpo (ventrículo esquerdo) (GUYTON & HALL, 2011).

Nas duas câmaras do coração há valvas que são responsáveis por impedir a volta do sangue após a contração, garantindo portanto, um fluxo unidirecional. As valvas presentes entre os átrios e ventrículos são chamadas de valvas atrioventriculares, que são formadas por folhetos finos e unidos a um anel de tecido conjuntivo, estes folhetos por sua vez, possuem maior espessura ao se aproximarem das bordas e se ligam aos ventrículos através das cordas tendíneas (tendões colagenosos). Há também os músculos papilares que promovem estabilidade para as cordas tendíneas. Quanto às valvas presentes entre os ventrículos e artérias, estas são denominadas de valvas semilunares aórtica (porção esquerda do coração) e pulmonar (porção direita do coração), ambas possuem três

folhetos e devido ao seu formato (semelhante a lua na fase crescente) não necessitam de cordas tendíneas (SILVERTHORN, 2017).

O ventrículo direito, distingue-se do ventrículo esquerdo nos âmbitos embriológico (ventrículo esquerdo origina-se no campo cardíaco primário enquanto que o direito tem origem no secundário) estrutural e funcional (FRIEDBERG & REDINGTON, 2014; VISWANATHAN et al., 2018). Sua parede é delgada na forma de meia-lua, ao contrário do ventrículo esquerdo que é circular/elipsoidal, além de menor massa muscular. As valvas atrioventriculares direita e esquerda também são diferentes; a valva do lado direito possui três folhetos chamada de tricúspide; já a valva do lado esquerdo possui apenas dois folhetos, chamada de bicúspide ou mitral (SILVERTHORN, 2017). O miocárdio do ventrículo esquerdo possui paredes lisas grossas e trabéculas finas; o ventrículo direito apresenta o oposto, paredes finas e fortemente trabeculadas (FRIEDBERG & REDINGTON, 2014).

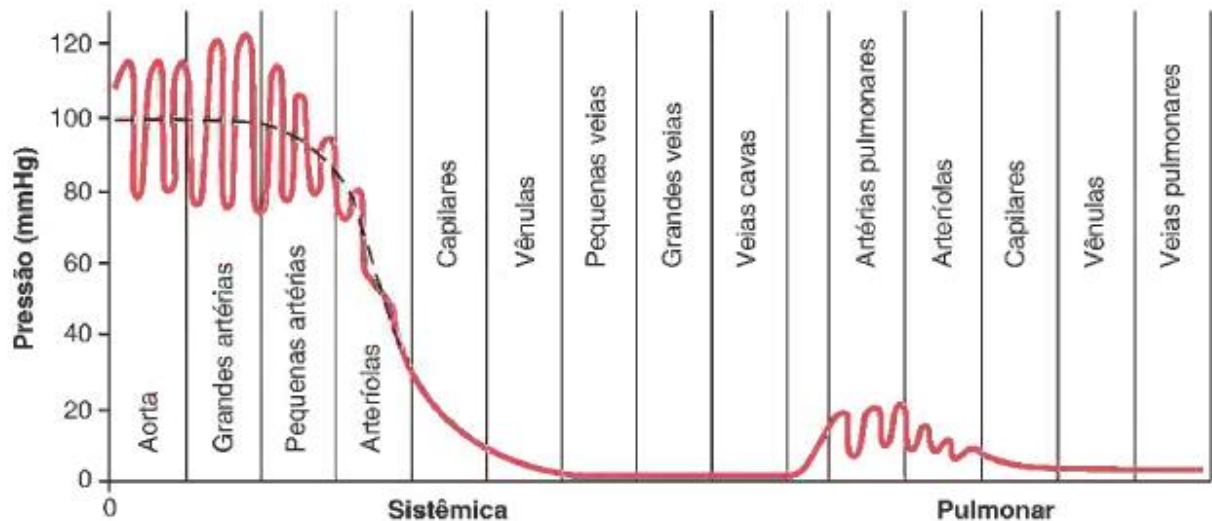
O ritmo cardíaco, que faz com que o coração contínua e organizadamente contraia (sístole) e relaxe (diástole) ocorre por meio da propagação de potenciais de ação pelo músculo cardíaco (GUYTON & HALL, 2011). O impulso elétrico é gerado no nodo sinusal (também chamado de nodo sinoatrial), que propaga-se para os átrios. Ao chegar no nodo atrioventricular, ocorre uma redução da velocidade de propagação, ou seja, um retardo fisiológico na condução do impulso elétrico, para que os átrios possam ejetar totalmente o sangue que irá para os ventrículos, antes que ocorra a sístole ventricular. Ao passar pelo nodo atrioventricular e atingir o feixe atrioventricular (feixe de His), o impulso elétrico propaga-se rapidamente através das fibras de Purkinje, que por sua vez, distribuem a corrente elétrica para o miocárdio ventricular (THALER, 1997).

É importante ressaltar sobre as características dos leitos vasculares presentes na circulação, as artérias (aorta e pulmonar) transportam o sangue sob elevada pressão (cada uma com pressões de acordo com sua capacidade), conseqüentemente possui paredes vasculares fortes constituídas principalmente por fibras de elastina, fibras de colágeno e músculo liso para suportar a elevada pressão; as arteríolas possuem menor diâmetro e servem como condutos de controle na passagem do sangue pelos capilares, logo, tem a capacidade de contrair e relaxar o vaso alterando o fluxo sanguíneo nos tecidos de acordo com a necessidade, tendo em vista este fator, as arteríolas possuem maior quantidade de músculo liso. Na circulação pulmonar é notório que as artérias e arteríolas possuem camada muscular lisa descontínua além de membrana elástica interna simples, logo, elas são mais semelhantes às vênulas do que às artérias da circulação sistêmica (AIRES, 2012).

Os capilares apresentam diâmetro ainda menor, e possuem apenas camada endotelial além de pequenos poros, isto é devido a sua função pois os capilares permitem a passagem de nutrientes, hormônios, eletrólitos e outras substâncias do sangue para o líquido intersticial. Há também as vênulas que são coletoras de sangue, as quais gradualmente se tornam maiores, sendo denominadas de veias que levam o sangue de volta para o coração. As vênulas, além da camada endotelial, possuem pequena quantidade de elastina, músculo liso e fibras de colágeno; já as veias apresentam as mesmas características só

que em maior quantidade. Vale lembrar que a pressão é elevada nas artérias e diminui proporcionalmente até chegarem nas veias (Figura 1) (AIRES, 2012; GUYTON & HALL, 2011).

Figura 1: Representação ilustrativa da pressão sanguínea nos diferentes leitos vasculares da circulação sistêmica e pulmonar (GUYTON & HALL, 2011).



Após a passagem, entre os capilares para os tecidos, de nutrientes assim como de O_2 e outros gases, a concentração de O_2 presente nestes capilares diminui, como visualizado na figura 2, representado pela cor azul, posteriormente, o sangue com baixa concentração de oxigênio, segue dos capilares para vênulas e depois para as veias, onde estas se unem e formam as veias cavas superior e inferior que desembocam no átrio direito, em seguida este sangue é direcionado para o ventrículo direito, que por meio da sístole ventricular é ejetado para a artéria pulmonar, onde este fluxo sanguíneo seguirá para os pulmões, ou seja, as ramificações das artérias trafegam com os brônquios para as zonas respiratórias, até que nos capilares há a formação de densas redes em torno dos alvéolos, o que proporciona a difusão, logo, haverá o aumento da concentração de oxigênio no sangue, representado pela cor vermelha na figura 2.

A posteriori, o sangue, por meio das veias pulmonares desembocam para o átrio esquerdo que logo em seguida passam pela válvula atrioventricular, e ventrículo esquerdo. Com a sístole ventricular, o sangue ejetado, com elevada concentração de O_2 , flui pela aorta e segue sendo distribuído por todo o corpo (SILVERTHORN, 2017; BERNE & LEVY, 2009; GUYTON & HALL, 2011). A circulação pulmonar tem a função de troca dos gases O_2 e CO_2 com a atmosfera (GREYSON, 2010; AIRES, 2012), que tem como consequência elevar a concentração de oxigênio no sangue, para que este seja distribuído, através da circulação sistêmica, para todos os tecidos.

Esta troca gasosa se dá com as diferenças da pressão parcial de oxigênio e gás carbônico (P_{O_2} e P_{CO_2} respectivamente) entre os alvéolos e o sangue venoso sistêmico. A priori temos que a P_{O_2} alveolar normal é de aproximadamente 100mmHg, enquanto que no sangue

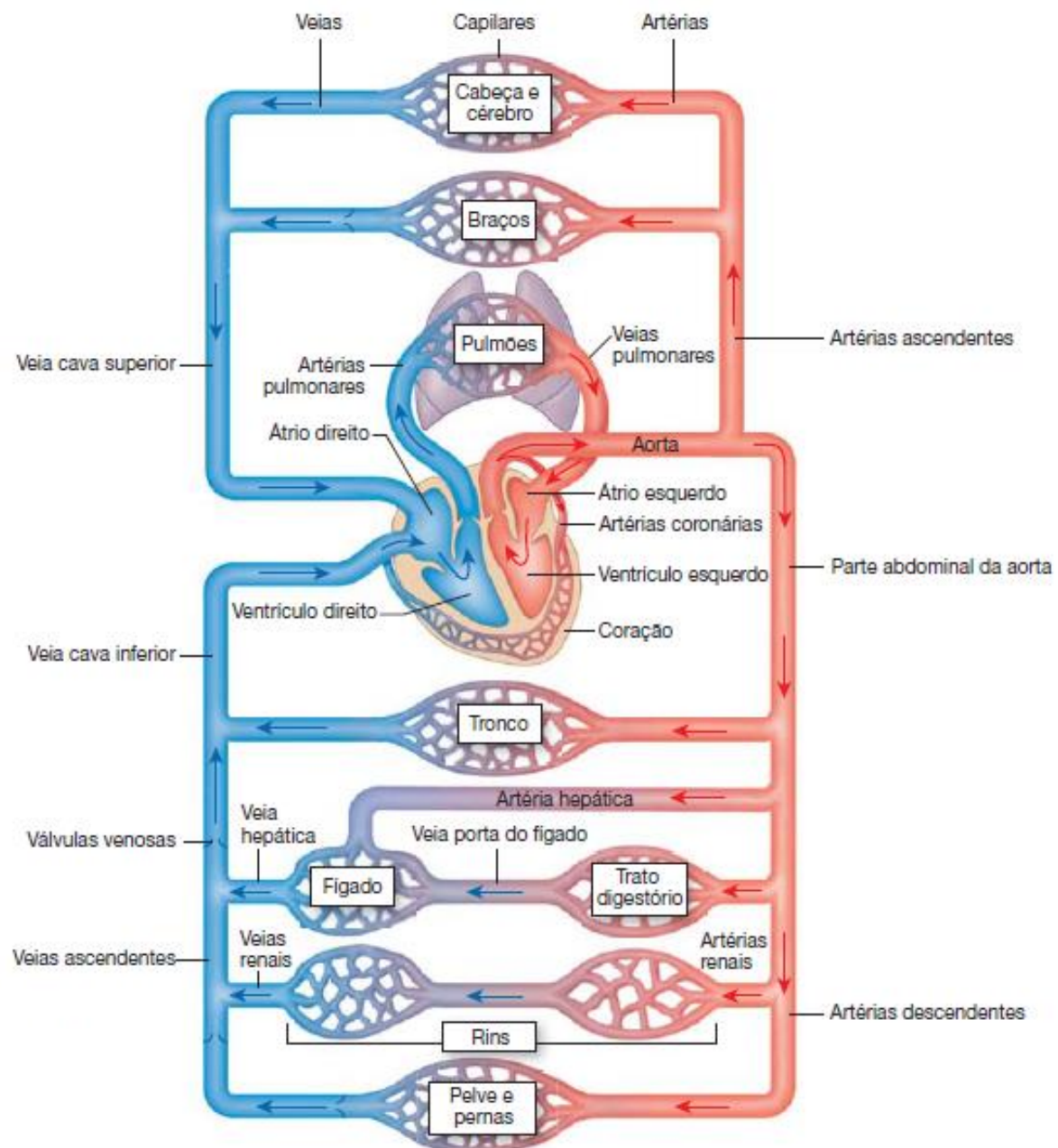
venoso sistêmico é de 40mmHg. Os gases individuais migram de regiões de pressão parcial mais alta para regiões de pressão parcial mais baixa, consequentemente, o O_2 move-se dos alvéolos (que apresenta alta pressão parcial) para os capilares pulmonares (que apresenta baixa pressão parcial) (SILVERTHORN, 2017) (Figura 3).

A difusão atinge seu equilíbrio, e a P_{O_2} do sangue arterial que sai dos pulmões iguala-se a dos alvéolos como visto na figura 3. Como discutido anteriormente, o sangue chega ao átrio esquerdo e posteriormente é ejetado para aorta por meio da sístole ventricular, onde alcança os capilares teciduais. As células requerem de forma constante o O_2 , logo a pressão intracelular é de aproximadamente 40mmHg, tendo vista este fato, o O_2 se difunde para as células, visto que a pressão parcial é menor. Novamente ocorre um equilíbrio entre as pressões parciais e o sangue venoso continua o fluxo com P_{O_2} de 40mmHg, o qual é levado novamente para o lado direito do coração para que alcance os pulmões para haver um novo aporte de O_2 (SILVERTHORN, 2017; SILVERTHORN, 2010) (Figura 3).

A difusão com o CO_2 ocorre na mesma forma que de O_2 , sendo que de forma inversa, a P_{CO_2} é maior nos tecidos (46mmHg) devido a sua produção durante metabolismo; do que nos alvéolos 40mmHg, logo, haverá a saída do CO_2 das células para os vasos, fazendo com que a difusão atinja o equilíbrio, consequentemente o sangue venoso atinge a mesma P_{CO_2} que os tecidos (46mmHg), posteriormente, este sangue flui para o lado direito do coração e ao chegar nos alvéolos, ocorre a saída de parte deste CO_2 , igualando novamente as pressões parciais (Figura 3). O sangue flui por meio das veias pulmonares e alcançam o lado esquerdo do coração, onde serão ejetados para a aorta e distribuídos por todo o corpo até chegarem aos tecidos, os quais apresentam uma alta P_{CO_2} , repetindo o ciclo (SILVERTHORN, 2017; SILVERTHORN, 2010) (Figura 3).

A circulação pulmonar, possui baixa pressão, sendo a sistólica aproximadamente 25mmHg e a diastólica 8mmHg, ao contrário da circulação sistêmica que apresenta pressão sistólica de 120mmHg e diastólica de 80mmHg, ademais a circulação pulmonar possui baixa resistência e alta complacência ao ventrículo direito, o que vai de acordo com as necessidades dos pulmões, pois, como já demonstrado anteriormente, expõe o sangue presente nos capilares pulmonares ao O_2 (GUYTON & HALL, 2011).

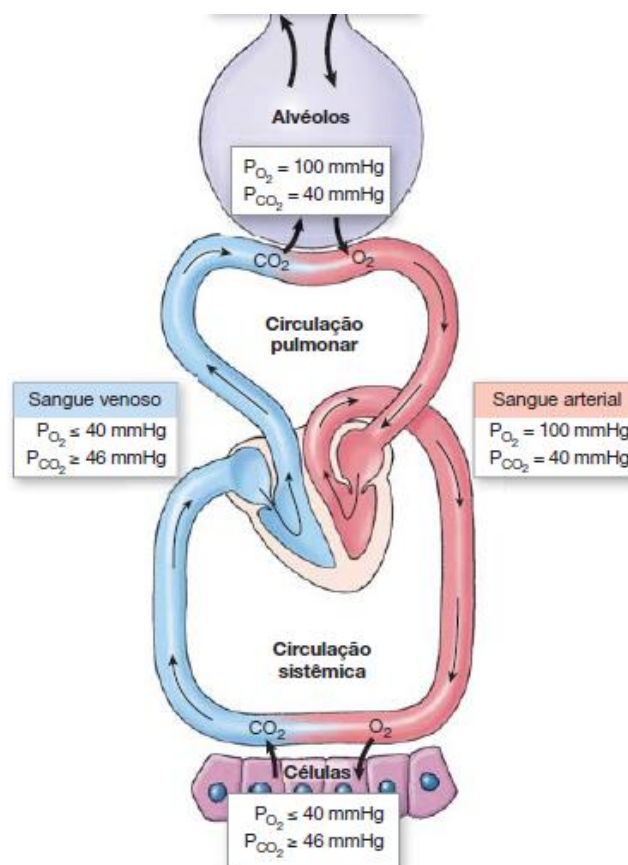
Figura 2: Representação ilustrativa do sistema circulatório. O sistema circulatório é composto pelo coração, vasos sanguíneos, e sangue; é um compartimento fechado onde as artérias transportam o sangue para os tecidos e as veias conduzem o sangue de volta para o coração (SILVERTHORN, 2017).



A regulação da circulação pulmonar ocorre por meio da detecção de oxigênio, o qual seu mecanismo pode estar relacionado com canais de potássio sensíveis a voltagem ou ao cálcio, prostaglandinas, catecolaminas, endotelina, NO, ou ainda espécies reativas de oxigênio, mas, ainda não está totalmente claro (GREYSON, 2010; SOMMER et al., 2008), ademais as fosodiesterases (PDEs) estão presentes na artéria pulmonar para regular o tônus vascular pulmonar (RABE et al., 1994). Os vasos pulmonares são inervados por fibras nervosas simpáticas, parassimpáticas, e fibras sensoriais. Os neurônios simpáticos, mediados pela noradrenalina via α -adrenoreceptores, aumentam a resistência vascular pulmonar e diminuem a complacência; em contrapartida, os neurônios parassimpáticos

desencadeiam o vasorelaxamento por meio via da colinérgica. O NO e VIP, os quais são produzidos pelos axônios perivasculares, também favorecem o vasorelaxamento (KUMMER, 2011). As fibras sensoriais podem desencadear tanto um vasorelaxamento, quanto vasoconstrição. Os microvasos pulmonares são inervados pelas fibras sensoriais C, que liberam em seus terminais nervosos a substância P, que atua como um vasoconstritor, e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), que é um vasodilatador pulmonar (LO et al., 2018).

Figura 3: Representação ilustrativa das diferenças de pressões parciais de O_2 e CO_2 no sistema circulatório sistêmico e pulmonar. A P_{O_2} é maior nos alvéolos do que no sangue venoso sistêmico; enquanto que a P_{CO_2} é menor nos alvéolos e maior no sangue venoso sistêmico (SILVERTHORN, 2017 - adaptado).



1.2 Hipertensão Pulmonar

A hipertensão pulmonar (HP) é uma doença crônica, progressiva e rara, a qual é caracterizada pelo aumento no tônus vasoconstritor, trombose *in situ*, e formações de lesões plexiformes (produção exacerbada e desordenada de células musculares lisas e endoteliais), o que acarreta na elevação da pressão arterial pulmonar média (maior ou

igual a 25mmHg) que culmina na elevação da pressão no ventrículo direito, ocasionando insuficiência ventricular direita e morte (MONTANI et al., 2013; RANCHOUX et al., 2016; ALENCAR et al., 2013; TABIMA et al., 2012; HAMBLY et al., 2016; MONTANI et al., 2014; GALLÉ et al., 2016).

Esta doença pode ter causa idiopática (ALIOTTA et al., 2017) ou estar associada a outras condições clínicas como a cardiopatia congênita, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, ingestão de drogas anorexígenas, esclerodermia, predisposição hereditária (KOLETTIS et al., 2007; LAJOIE et al., 2017), anemia crônica, esquistossomose, e também pode ser advinda através da hipertensão pulmonar persistente de recém-nascidos ou hipertensão arterial pulmonar secundária a uma doença veno-oclusiva e/ou hemangiomatose capilar pulmonar (LAI et al., 2014).

No final dos anos 60 houve uma epidemia na Áustria, Alemanha e Suíça onde os primeiros casos de HP foram constatados, estes casos foram em detrimento da administração do aminorex fumarato, uma droga anorexígena (JARDIM & WAETGE., 2018; PEACOCK, 2011). Posteriormente, em 1973 na Genebra, Suíça ocorreu o primeiro simpósio internacional sobre HP organizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que reuniu clínicos, patologistas, epidemiologistas e outros profissionais em busca para melhor compreensão desta patologia, conseqüentemente foi proposto um registro internacional em HP, onde o primeiro caso publicado, neste registro, foi em 1991 (JARDIM & WAETGE., 2018) que proporcionou conhecimento sobre as características hemodinâmicas da doença e sua associação com a sobrevida dos pacientes (D' ALONZO et al., 1991).

Anteriormente a HP era dividida de forma simples, como HP primária (sem causas aparentes para o indivíduo ser acometido da doença) e HP secundária (ocasionada em consequência de alterações cardíacas e/ou pulmonares) (SIMONNEAU et al., 2004; DA SILVA et al., 2017; JARDIM & WAETGE., 2018). O segundo simpósio, em 1998 na cidade de Evian, França propôs a primeira tabela de classificação da HP para que médicos e pesquisadores pudessem delinear mais adequadamente suas pesquisas e tratamento.

A tabela consistia em cinco grupos que são: hipertensão arterial pulmonar; hipertensão pulmonar venosa; hipertensão pulmonar associada a enfermidades do sistema respiratório ou hipóxia; hipertensão pulmonar causada por doença trombótica ou embólica crônica; e hipertensão pulmonar causada por doenças que afetam diretamente os vasos pulmonares. No ano de 2003, em Veneza, Itália houve o terceiro simpósio onde foram feitas pequenas modificações na tabela criada no segundo simpósio, todavia, mantiveram a classificação contendo os cinco grupos e também atualizaram os fatores de risco (SIMONNEAU et al., 2004; PEACOCK., 2011). A classificação é feita com base nas semelhanças dos mecanismos fisiopatológicos, quadros clínicos e também abordagens terapêuticas (ROMANO, 2010; ARAÚJO, 2010).

O quarto simpósio que ocorreu em 2008 na cidade Dana Point, Califórnia (MONTANI et al., 2013), houve modificações de nomenclatura como por exemplo, o termo hipertensão arterial pulmonar familiar foi alterado para hipertensão arterial pulmonar

hereditária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014); já o quinto simpósio, em Nice, França em 2013 evidenciou as adaptações que ocorrem com o ventrículo direito em consequência da HP (JARDIM & WAETGE, 2018).

Recentemente, no primeiro semestre de 2018, também em Nice, França ocorreu o sexto simpósio, entre os objetivos propostos pelo simpósio havia revisar os principais avanços na ciência vascular pulmonar nos últimos 5 anos; analisar as evidências em diferentes áreas básicas e clínicas; discutir os documentos apresentados entre os participantes; e elaborar artigos revisados para serem incluídos no simpósio (6TH WORLD SYMPOSIUM ON PULMONARY HYPERTENSION). O ventrículo direito continuou sendo enfatizado, todavia, lesões plexiformes e lesões venosas e venulares também foram pontos chaves nas discussões (GALIÈ et al., 2018).

De forma geral, há que a cada 1 milhão de pessoas há 15 indivíduos acometidos com a HP (SUEN et al., 2016; RICH & RICH, 2014; GALIÈ et al., 2018; JÚNIOR et al., 2014), mas sugere-se que possa haver um índice maior, como por exemplo nos EUA, já que aproximadamente 14 milhões de pessoas apresentam doença pulmonar obstrutiva crônica, que pode desencadear a HP (JÚNIOR, 2014).

No Brasil, há poucos registros sobre a HP, LAPA et al. (2006) realizaram uma pesquisa em dois centros de referência em São Paulo para o tratamento de HP. Os dados obtidos mostraram que 50% dos pacientes apresentaram HP idiopática, 30% associada à esquistossomose, 10% dos pacientes apresentaram HP relacionada a doença do tecido conectivo, 33% para hipertensão portopulmonar e 4% associada a drogas anorexígenas.

A idade também foi avaliada, mostrando que indivíduos portadores de HP idiopática possuem em média 42 anos de idade; associada a esquistossomose, 40 anos; doença no tecido conjuntivo, 50 anos; 48 anos para hipertensão portopulmonar; e associada a drogas anorexígenas, 33 anos (LAPA et al., 2006). MACHADO et al. (2009) realizaram uma investigação sobre a HP no ambulatório de referência na Bahia, onde foi observado que 50% eram provenientes de causa idiopática, 20% esquistossomose, 17% cardiopatia congênita, 11% tromboembolismo pulmonar e 2% foi classificado como “outros” a qual inseriu colagenose e hipertensão portopulmonar.

Quanto a prevalência dados internacionais mostram que 78.7% dos casos nos EUA ocorre em mulheres, enquanto que os homens, tem percentual de aproximadamente 63.1%. Na França o percentual foi de 78.8% para mulheres e 65.3% para os homens (FROST et al., 2011). Este fato se deve possivelmente pelos hormônios sexuais femininos, como o estrogênio e seus metabólitos que podem influenciar a fisiopatologia da HP, todavia, os mecanismos para seu desenvolvimento através dos hormônios ainda permanecem desconhecidos (MAIR et al., 2014; TOFOVIC et al., 2010; WHITE et al., 2011). Sem tratamento, pacientes acometidos pela HP tem como expectativa de vida em média 3 anos em detrimento da insuficiência ventricular direita (PEACOCK., 2011; McGOON & KANE, 2009; FALLAH, 2015).

Os sinais e sintomas desta patologia são inespecíficos e muitas vezes só aparecem quando a doença já está avançada. Entre os sintomas estão a dispneia, fadiga, exaustão e

síncope, sendo este último visto principalmente após esforço físico. Na descompensação cardíaca as pressões do enchimento cardíaco direito aumentam, com a típica tríade de congestão venosa cervical, ascite e edema (HOEPER et al., 2017).

A HP está relacionada a disfunção endotelial, cardíaca e pulmonar. Nos pulmões ocorre fibrose, redução da perfusão e aumento do tamanho dos alvéolos pulmonares (JÚNIOR et al., 2010). Quanto ao endotélio, este, é uma camada única de células que reveste todos os vasos sanguíneos e o coração, ademais, possui grande importância para a homeostasia vascular pois promove o controle da passagem de pequenas e grandes moléculas, dilatação e contração local, mantém a estrutura da parede vascular e fluidez do sangue por meio da regulação da trombose, fibrinólise e agregação plaquetária, além de promover formação de novos vasos sanguíneos (DWORAKOWSKI et al., 2008), logo, um desequilíbrio em sua função, conhecido como disfunção endotelial, tem importante papel para a patogênese da HP (ABDELAZIZ et al., 2015).

Este desequilíbrio é proveniente do aumento ou diminuição na produção de fatores vasoconstritores, como a endotelina, angiotensina II e prostaglandinas; e fatores vasodilatadores derivados do endotélio, como por exemplo prostaciclina e fator hiperpolarizante do endotélio (CARVALHO et al., 2001; MONTANI et al., 2014), além da diminuição da produção do óxido nítrico (NO) e aumento da síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando um estresse oxidativo (CARVALHO et al., 2001).

Esta disfunção endotelial está intrinsecamente relacionada com o remodelamento vascular, ou seja, o dano causado na estrutura do vaso, que é outra importante característica da HP. De forma geral temos que nas artérias pulmonares ocorre lesão na camada íntima, espessamento medial e remodelamento da camada adventícia. Na camada íntima o dano nas células endoteliais e sua apoptose, a qual pode estar relacionada com a diminuição do receptor de proteína morfogenética óssea tipo 2 (BMP2), que tem sido a principal causa da HP hereditária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; PEACOCK, 2011), gera o aumento da liberação de fatores parácrinos que atuam como fatores de crescimento que induzem a proliferação e migração das células musculares lisas ou quimiocinas, que consequentemente recrutam células circulantes inflamatórias (Figura 4), as citocinas pró-inflamatórias presentes na HP são a IL-1, IL-6 e TNF- α (ALENCAR et al., 2013).

Além disso, as células endoteliais podem se transformar em miofibroblastos que geram constrição de longa duração. O espessamento da camada medial está fortemente relacionado com o dano causado nas células endoteliais, pois como mencionado anteriormente, corrobora para a proliferação das células musculares lisas, que estas por sua vez, apresentam hipertrofia e hiperplasia caracterizando o espessamento medial; ademais a diminuição da atividade do BMP2 também leva ao espessamento medial assim como ao estreitamento arteriolar (YANG et al., 2013).

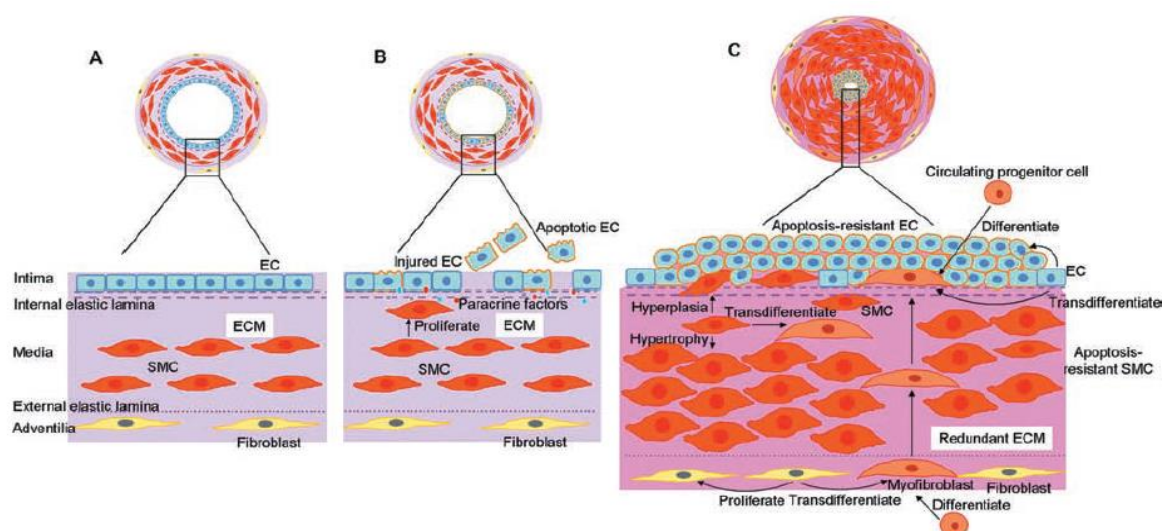
As células progenitoras endoteliais (CPEs) também estão relacionadas ao desenvolvimento da HP (Figura 4). As CPEs são células mononucleares específicas (PAN et al., 2015), que podem ser encontradas na medula óssea, sangue periférico e sangue do cordão umbilical (ZHOU et al., 2017). Em condições fisiológicas, estas células são liberadas

da medula óssea e migram para onde há o dano tecidual, promovendo o reparo. Sua liberação na medula óssea é regulada por fatores de crescimento, ligantes, enzimas e receptores de superfície (HRISTOV et al., 2003).

Não obstante, dados experimentais, como o trabalho de ALIOTTA et al. (2017), mostraram que ao injetar CPEs isoladas de ratos induzidos à HP, em ratos saudáveis, estes animais passaram a apresentar características da HP. Ademais as análises de quantificação demonstraram que as CPEs foram encontradas em baixos níveis. TOSHNER et al. (2009) utilizaram amostras de pacientes com HP idiopática, hereditária e relacionada a doenças congênitas do coração. Foi visto que as CPEs estavam presentes nos três tipos de HP estudadas, principalmente nas lesões plexiformes, e também, foi observado que estas células estavam com sua capacidade prejudicada para exercer suas funções normais.

Outro fator importante no desenvolvimento da HP é o aumento da pressão luminal que consequentemente culmina em uma hipertrofia adaptativa do músculo vascular, que também corrobora para o espessamento medial; na camada adventícia ocorre a proliferação de fibroblastos (YANG et al., 2013) (Figura 4). Logo, vemos que a HP apresenta mudanças celular e estrutural nas paredes das artérias pulmonares que culminam na disfunção endotelial e remodelamento vascular (ABDELAZIZ et al., 2015).

Figura 4: Alterações nas camadas íntima, média e adventícia da artéria pulmonar. A. Imagem representativa do vaso pulmonar e suas respectivas camadas (íntima, média e adventícia). B. Com a lesão endotelial as células endoteliais produzem e liberam fatores parácrinos, os quais atuam como fatores de crescimento para induzir a proliferação e migração das células musculares lisas. C. Em estágio avançado as células endoteliais e musculares lisas apresentam resistência apoptótica, alterando a estrutura do vaso, conhecido como remodelamento vascular pulmonar. As células musculares lisas além de hiperplasia também sofrem hipertrofia corroborando para o remodelamento e estreitamento da área luminal. Na camada adventícia ocorre aumento acentuado de fibroblastos (YANG et al., 2013 - adaptado).

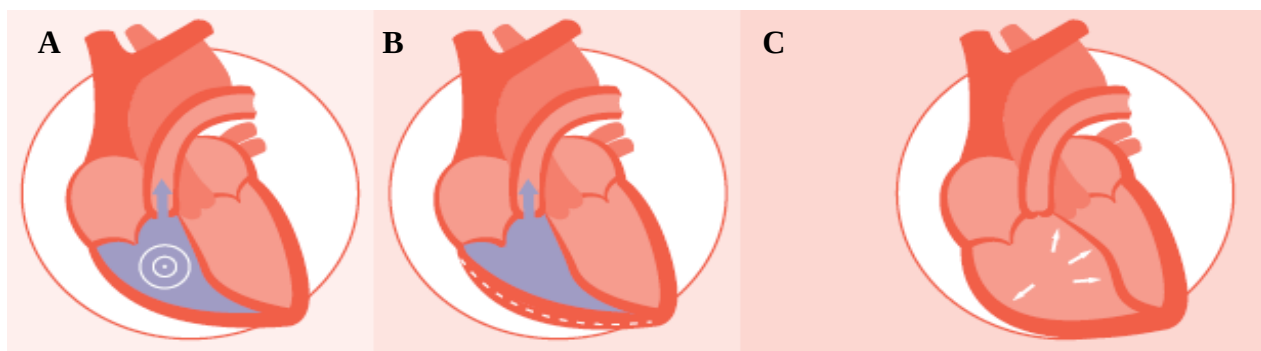


Com o aumento da pós-carga em detrimento da elevação da pressão e resistência vascular pulmonar, inicialmente ocorrem mudanças adaptativas no ventrículo direito para manter o débito cardíaco (SUTENDRA & MICHELAKIS, 2014; CALLOU & RAMOS,

2009), fazendo com que haja um aumento na espessura da parede, consequentemente melhora a contratilidade cardíaca, ademais, as funções sistólica e diastólica são preservadas (NOORDEGRAAF et al., 2013) (Figura 5 A e B). Todavia, ao contrário da hipertrofia ventricular esquerda, que gera a hipertensão sistêmica, o mecanismo compensatório do ventrículo direito é menor (SUTENDRA & MICHELAKIS, 2014).

Consequentemente, o contínuo estreitamento das artérias pulmonares, assim como o aumento da pós-carga faz com que estas mudanças se transformem em remodelamento mal adaptativo, pois o ventrículo direito continua a dilatar-se, tendo insuficiente angiogênese, inflamação excessiva e fibrose, gerando disfunção estrutural e funcional cardíaca (HUR & SUGENG, 2019). Sob estresse mecânico, os miócitos aumentam a duração do potencial de ação e consequente contratilidade (NOORDEGRAAF et al., 2013). Estes fatores culminam na hipertrofia ventricular direita (Figura 5 C), dessa forma, o ventrículo direito que em condições normais, apresenta anatomicamente, formato de meia-lua, muda sua conformação por um formato mais arredondado (VISWANATHAN et al., 2018).

Figura 5: Esquema ilustrativo do desenvolvimento da hipertrofia ventricular direita e culminante insuficiência ventricular direita. A. O estreitamento dos vasos pulmonares acarreta no aumento da pós-carga ventricular direita. B. O ventrículo direito se adapta através do aumento da contratilidade muscular e espessamento da parede. C. Contínuo espessamento da parede, ocasiona a hipertrofia cardíaca, subsequentemente insuficiência ventricular direita e morte (NOORDEGRAAF et al., 2017 - adaptado).



Na tentativa de impedir a progressão da doença várias substâncias foram desenvolvidas, como os diuréticos, já que a insuficiência cardíaca direita ocasiona retenção de líquido, congestão hepática, ascite e edema periférico (MONTANI et al., 2013); os prostanóides como o epoprostenol, trepopostenil; antagonistas dos receptores de endotelina (bosentano), e os inibidores de fosfodiesterase tipo 5, que são o sildenafil e tadalafila (MONTANI et al., 2014), todavia estes tratamentos para HP, em sua maioria, têm alto custo e são baseados em vasodilatadores que apenas aliviam os sintomas, mas não levam a cura (VARSHNEY et al., 2016) além dos efeitos adversos que causam.

Em busca de melhor compreensão da fisiopatologia da HP, tem sido utilizado modelos experimentais induzidos à hipertensão através da super expressão do transportador de serotonina (5-HT) (SHIMODA & LAURIE, 2013) hipóxia crônica (SUEN et al., 2016; ZHOU et al., 2017; NISHIKAWA et al., 2018) e monocrotalina (ZHAO et al., 2005;

LOON et al., 2015; MIRSKY et al., 2011; MORRELL et al., 2013; PAN et al., 2015). Neste trabalho utilizamos a monocrotalina como modelo experimental para indução da HP.

1.3 Monocrotalina

Plantas da família Leguminosae (Fabaceae) pertencentes ao gênero *Crotalaria* apresentam alcaloides pirrolizidínicos, os quais são as principais toxinas que causam sérios danos em humanos e animais (JÚNIOR et al., 2010; PITANGA et al., 2012), incluindo a HP e hipertrofia ventricular direita (HUXTABLE, 1990).

As espécies do gênero *Crotalaria* estão presentes nas zonas tropicais e subtropicais, sendo facilmente encontradas em pastos e plantações, e consequentemente considerada uma planta invasora (PITANGA et al., 2012). No Brasil, há aproximadamente 40 espécies, sendo a *Crotalaria globifera*, *Crotalaria retusa*, *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria crispata* e *Crotalaria dura* as mais conhecidas. Popularmente as plantas do gênero *Crotalaria* são chamadas de “xique-xique”, “chocalho de cascavel” ou “guizo de cascavel” (JÚNIOR et al., 2010) devido aos seus frutos, pois quando estão secos geram som semelhante ao chocalho de cobra quando tocados (BOGHOSSIAN et al., 2007).

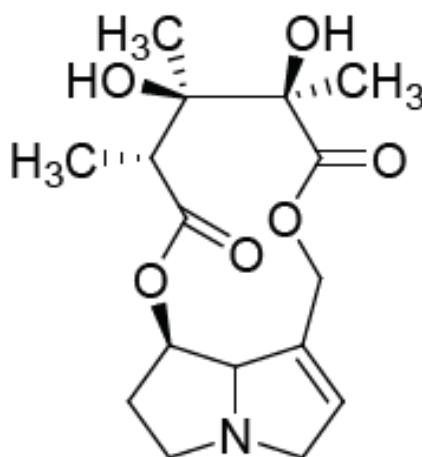
Dentre os alcaloides pirrolizidínicos está a monocrotalina, toxina que tem sido utilizada para a indução da HP, em modelos experimentais, devido a sua semelhança com a fisiopatologia em humanos, pois gera remodelamento vascular, proliferação das células musculares lisas da artéria pulmonar, disfunção endotelial, estresse oxidativo, infiltração leucocitária, aumento no número de citocinas inflamatórias (CSISZAR et al., 2009), e redução da eNOS (LUDKE et al., 2010), podendo levar à morte em torno de 4 a 6 semanas após administração, quando não tratado (VARSHNEY et al., 2016), ademais, a monocrotalina é um método simples e de baixo custo (POLONIO et al., 2014). Vale salientar que a monocrotalina pode ser administrada via subcutânea (MAM et al., 2010; KASS et al., 2012) ou intraperitoneal (ZAPATA-SUDO et al., 2012; ALENCAR et al., 2012), e cerca de 8 a 16 horas após a administração, é possível ser observado infiltrado inflamatório mononuclear na camada adventícia de artérias e veias (POLONIO et al., 2012).

Registros na literatura científica mostram os efeitos da intoxicação pela monocrotalina em diversos animais (DE SOUZA et al., 1997). Em equinos, foi observado que a intoxicação pela monocrotalina causou lesões pulmonares como alveolite fibrosante difusa com espessamento dos septos alveolares e infiltrado inflamatório intersticial formado por macrófagos (LUCENA et al., 2010). Estas alterações pulmonares vão de acordo com o trabalho de BOGHOSSIAN et al. (2007), que realizaram análise científica utilizando bovinos como modelos experimentais. Eles utilizaram sementes moídas de *Crotalaria mucronata* em diferentes dosagens para avaliar a toxicidade. As dosagens de 5g/Kg, 7,5g/Kg e 10g/Kg desencadearam efeitos tóxicos nos animais, principalmente lesões pulmonares, acarretando espessamento das paredes pulmonares através da proliferação de células mesenquimais e fibrose intersticial, infiltrado mononuclear e

eosinófilos, também foi visualizado espessamento das arteríolas pulmonares, diminuindo a sua área luminal.

A monocrotalina apresenta em sua estrutura molecular uma molécula de nitrogênio no anel heterocíclico (Figura 6), ademais é um alcaloide que possui efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, carcinogênicos, cardiotóxicos, inflamação, fetotóxicos, hemorragia e fibrose (BARRETO et al., 2006). Seu efeito pneumotóxico foi publicado pela primeira vez em 1942 (HARRIS et al., 1942). O mecanismo de ação da monocrotalina não está totalmente esclarecido, seu efeito é decorrente da oxidação no fígado (SHIMODA & LAURIE, 2013) através do citocromo P450, gerando portanto, o seu metabólico tóxico, dehidromonocrotalina (DHM) que interfere na síntese de DNA e proteínas (JÚNIOR et al., 2010).

Figura 6: Estrutura molecular da monocrotalina (JÚNIOR et al., 2010).



Nos pulmões a monocrotalina gera edema e congestão pulmonar com áreas no parênquima, o que culmina em lesão intersticial e arteriolar pulmonar, hemorragia, fibrose e inflamação (JÚNIOR et al., 2010), além de proliferação exacerbada de células musculares lisas e endoteliais ocasionando no remodelamento da artéria pulmonar, o que consequentemente leva ao aumento da pressão arterial pulmonar (VARSHNEY et al., 2016).

Nos rins ocorre glomerulonefrite, danos tubulares, necrose e vacuolização de hepatócitos; também foi observado que a monocrotalina pode atravessar a barreira hematoencefálica. A análise de astrócitos corticais de ratos evidenciou uma alteração na morfologia e crescimento celular, mostrando que a resposta astrocitária pode estar relacionada aos danos causados no sistema nervoso central (SNC) (BARRETO et al., 2006).

XIAO et al. (2017) observaram que a monocrotalina tem a capacidade de se ligar aos receptores sensíveis de cálcio extracelular pois estes receptores, assim como os aminoácidos de cisteína, histidina e triptofano, contém em sua forma estrutural a

disponibilidade para a ligação da monocrotalina. O receptor sensível ao cálcio extracelular, especificamente, se torna um meio para a sinalização e consequente mobilização de cálcio das células endoteliais, o que corrobora para a injúria endotelial e disfunção da vasculatura pulmonar, levando portanto à HP.

Outrossim, um dos pontos principais de atuação na monocrotalina é a indução da hipertrofia ventricular direita, o que é decorrente do aumento da pós-carga no ventrículo direito, que consequentemente gera uma dilatação e insuficiência cardíaca. O coração apresenta uma redução da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático, prolongando o potencial de ação e alteração nos túbulos transversos; na hipertrofia ventricular a propagação dos canais Ca^{2+} ocorrem lentamente, favorecendo a contratilidade miocárdica (KÖGLER et al., 2003; MIURA et al., 2011).

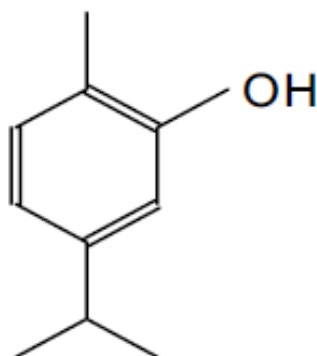
1.4 Carvacrol

Óleos essenciais são conceituados como complexas misturas de substâncias voláteis, de baixo peso molecular e geralmente lipofílicas, como os hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, álcoois e monoterpenos (BASTOS et al., 2010; MENEZES et al., 2010). Eles podem ser encontrados em folhas, raízes, sementes, cascas e frutas. De forma geral, na temperatura ambiente possuem aparência oleosa, além de terem aroma intenso e podem ser incolores ou amarelados. Os monoterpenos são reconhecidos por serem os principais constituintes dos óleos essenciais (GRABMANN, 2006).

Os monoterpenos apresentam em sua estrutura duas unidades de isopreno, estes fazem parte de uma das classes dos terpenóides, os quais são caracterizados por apresentarem isopreno como unidade básica. A classificação dos terpenos é de acordo com o número de isoprenos presentes em sua estrutura, sendo portanto, denominados como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos (PADUCH et al., 2007). Dados na literatura científica demonstram que os monoterpenos possuem atividade antimicrobiana (GARCIA et al., 2008); hipotensora, vasorelaxante (BASTOS et al., 2010) e anticancerígena (CARNESECCHIA et al., 2004).

O carvacrol (Figura 7) é um monoterpeno fenólico, o qual tem como nomenclatura 5-isopropil-2-metilfenol (LIMA et al., 2012), que pode ser extraído de plantas aromáticas, como por exemplo das espécies *Origanum* e *Thymus* (OZER et al., 2017; SUNTRES et al., 2014; CARVALHO et al., 2003) conhecidas popularmente como orégano e tomilho respectivamente. Apresenta fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ e 150.22g/mol de peso molecular (ALMEIDA, 2015), possui coloração amarelo escuro (SIGMA ALDRICH, 2006) e é pouco solúvel em água, 0.11gL^{-1} (SAMARGHANDIAN et al., 2015).

Figura 7: Estrutura molecular do carvacrol (HORVATHOVA et al., 2007).



Este monoterpene fenólico apresenta propriedades de grande relevância para a indústria farmacêutica, tais como, ansiolítico, antitumoral, antibacteriano (SUNTRES et al., 2014), anti-inflamatório (ARIGESAVAN & SUDHANDIRAN, 2015; GUIMARÃES et al., 2012), antioxidante (SEN et al., 2014) e vasorelaxante (PEIXOTO – NEVES et al., 2009). Ademais, o carvacrol está relacionado aos canais TRP (canais Potencial Receptor Transiente).

TRPs são canais que promovem a passagem de cargas positivas para o interior da célula, podendo ocasionar ou não em um disparo de potencial de ação, eles podem ser divididos em seis famílias que são: canônicos (TRPC), vanilóide (TRPV), melastatina (TRPM), Ankyrin (TRPA), mucolipina (TRPML) e polycistina (TRPP) (EARLEY & BRAYDEN, 2015).

Estes canais podem ser estimulados através do estresse de cisalhamento, força mecânica, pressão, produtos inflamatórios e estresse oxidativo. No sistema cardiovascular os canais TRPs são expressos em diferentes tipos celulares e tem grande importância na regulação das funções celulares, como a proliferação, contração, relaxamento, diferenciação e morte celular (YUE et al., 2015). Entretanto, estes canais também estão presentes em processos patológicos (YU et al., 2004).

O carvacrol é considerado um ativador dos canais TRPV3 e TRPA1 (KUMAMOTO & FUJITA, 2016; EARLY et al., 2009; EARLY et al., 2010) que promovem uma vasodilatação, e inibidor em mamíferos, dos canais TRPM7, que em contrapartida favorecem a vasoconstrição (PARNAS et al., 2006). Os canais TRPM7 estão associados ao desenvolvimento e proliferação celular, no âmbito patológico estes canais estão envolvidos no desenvolvimento de células cancerígenas, CHEN et al. (2015), mostraram que o carvacrol ao inibir estes canais impediu a proliferação, migração e invasão de células de glioblastoma.

ZHANG et al. (2015) demonstraram em seu trabalho que o carvacrol atenua o remodelamento vascular pulmonar e a hipertrofia ventricular direita, de ratos induzidos a HP por meio da hipóxia, devido a sua ação apoptótica nas células musculares lisas. O carvacrol foi administrado via intraperitoneal, uma vez ao dia, durante 9 dias. Foram

analisadas três dosagens que foram, 25mg/kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg, onde apenas as concentrações de 50mg/Kg e 100mg/Kg demonstraram efeito.

Tendo em vista as propriedades que o carvacrol possui, assim como as características da fisiopatologia da HP, esta substância foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho, o qual tem como hipótese que o carvacrol reduz a hipertensão pulmonar e atenua a disfunção endotelial, de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Justificativa

2. Justificativa

A hipertensão pulmonar é considerada uma doença rara, grave, progressiva e possui mal prognóstico, o que acarreta em uma sobrevida de aproximadamente três anos quando não tratado (PEACOCK, 2011; McGOON & KANE, 2009; FALLAH, 2015). No Brasil, 50% dos casos é de origem idiopática e aproximadamente 30% associada a esquistossomose, todavia, acredita-se que a porcentagem de indivíduos com HP associados à esquistossomose seja maior, tendo em vista que há aproximadamente 8 a 10 milhões de indivíduos parasitados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; LAPA et al., 2006). Consequentemente, é de suma importância compreender a fisiopatologia desta doença para buscar promover medicamentos que sejam eficazes a longo prazo e que possam melhorar a qualidade de vida.

Desta forma, ao buscar uma substância promissora, que possua importantes propriedades como vasorelaxante (PEIXOTO-NEVES et al., 2009), antioxidante (SEM et al., 2014) e anti-inflamatória (ARIGESAVAN & SUDHANDIRAN, 2015), propriedades estas que vão de acordo com o que é procurado para o tratamento da HP, o carvacrol foi escolhido para ser nossa substância teste. Este trabalho é de grande importância para a comunidade científica pois ampliará não apenas o conhecimento da fisiopatologia da HP, mas também proporcionará maiores informações sobre o carvacrol, substância a qual tem demonstrado resultados promissores em outras patologias.

Objetivos

3. Objetivos

Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos do carvacrol no tratamento da hipertensão pulmonar no modelo experimental induzido pela monocrotalina.

Objetivos Específicos

- Evidenciar os efeitos do carvacrol sobre a pressão arterial pulmonar e hipertrofia ventricular direita de ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina;
- Avaliar o efeito do carvacrol frente aos agentes vasoativos acetilcolina, nitroprussiato de sódio e fenilefrina em anéis de artéria pulmonar de ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina;
- Avaliar o efeito do carvacrol sobre o remodelamento vascular pulmonar e estresse oxidativo em anéis de artéria pulmonar de ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1 Experimentos em Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 12 semanas de idade, com peso entre 250 a 350g fornecidos pela Unidade de Produção Animal do IPeFarM da Universidade Federal da Paraíba. Os animais permaneceram em gaiolas sob condições controladas de umidade, temperatura, ciclo claro-escuro de 12 horas e tendo livre acesso à água.

Após o período de adaptação os animais foram separados aleatoriamente em 5 grupos (Figura 8), denominados da seguinte forma:

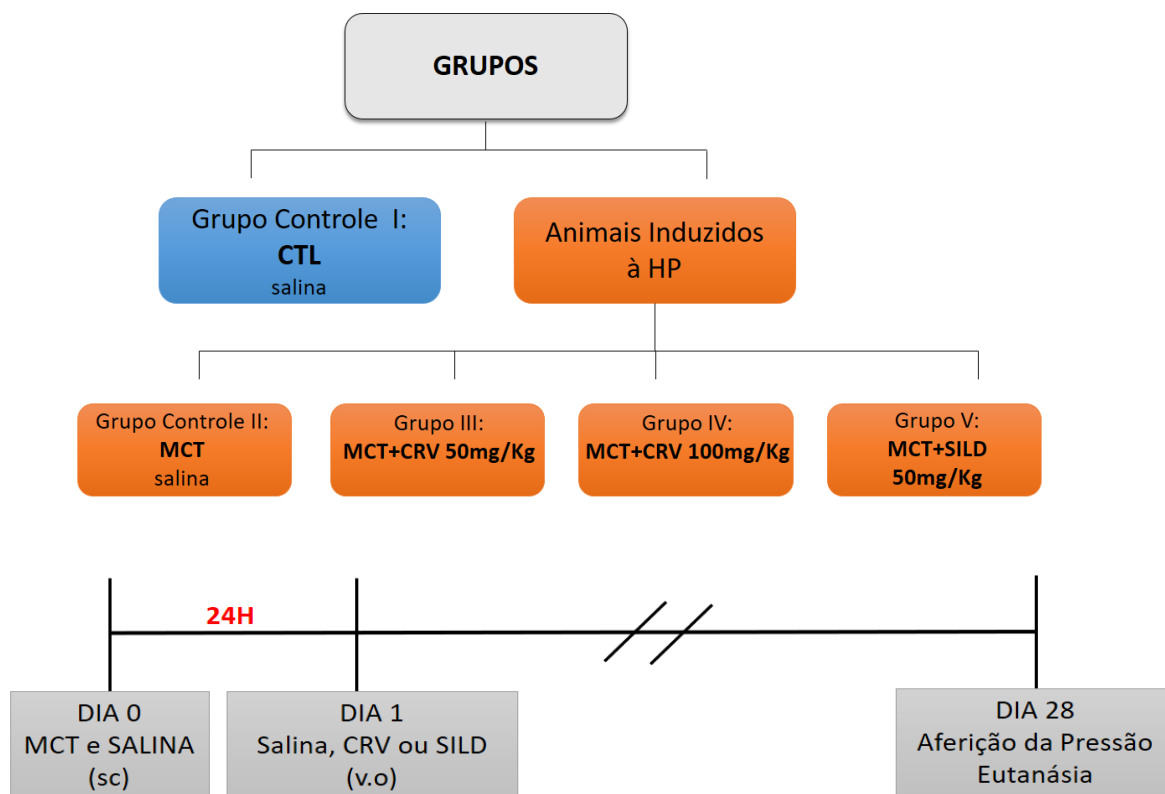
1. Grupo controle normotenso (CTL);
2. Grupo controle com HP (MCT);
3. Hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol (MCT + CRV 50mg/Kg);
4. Hipertensos tratados com 100mg/kg de carvacrol (MCT + CRV 100mg/Kg);
5. Hipertensos tratados com 50 mg/kg de sildenafil (MCT + SILD).

O primeiro grupo (grupo controle I) recebeu em única injeção subcutânea salina 0,9% (2mL/Kg), após 24h este grupo também recebeu salina via oral durante 28 dias. Os quatro grupos restantes foram induzidos à HP através de única injeção subcutânea de monocrotalina (60 mg/Kg).

Após 24h iniciou-se o tratamento com a mesma duração que o grupo 1, 28 dias, via oral por meio de sonda intragástrica com volume padronizado de 5 mL/Kg para todos os grupos, tendo o grupo MCT, salina para a gavagem, os grupos 3 e 4 com diferentes dosagens do carvacrol (50mg/Kg e 100 mg/Kg respectivamente) e o grupo 5 tratado com 50 mg/Kg de sildenafil, substância utilizada como controle positivo, já que a sildenafil é uma das formas de tratamento para HP em humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Todos os animais foram pesados no início e término do tratamento. Os experimentos desenvolvidos neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com certidão nº 1253040418 (ID 000266).

Figura 8: Esquema representativo do tratamento dos animais e seus respectivos grupos.

Fonte: Autora do presente trabalho.



4.2 Substâncias

Substância teste

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) (Figura 7) foi obtido através da Sigma-Aldrich Brasil LTDA (São Paulo – Brasil), o qual foi solubilizado em cremofor e posteriormente diluído em solução salina para ser administrado nos animais por via oral. Tendo em vista os resultados obtidos de experimentos anteriores realizados no laboratório, é importante salientar que o cremofor, veículo utilizado para solubilização da solução não promove efeitos que interfiram nas análises presentes neste trabalho.

Substâncias e Meios Utilizados

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de acetilcolina, cloridrato de L(-) fenilefrina, nitroprussiato de sódio, monocrotalina (crotalina) e citrato de sildenafil; todos obtidos da Sigma-Aldrich Brasil LTDA (São Paulo – Brasil). A monocrotalina foi diluída em HCl 1M e posteriormente ajustado o pH para 7.4 por meio de NaOH 1M (BUENO-BETI et al., 2018).

Soluções Nutritivas

Para o preparo do Krebs-Henseleit foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio (MgSO₄), fosfato monopotássico (KH₂PO₄), glicose (C₆H₁₂O₆) e cloreto de cálcio (CaCl₂)

(Tabela 1). Para o preparo do Krebs 80mM de KCl foi realizado uma substituição equimolar do Na^+ e K^+ para o ajuste isosmótico da solução (Tabela 1). Todas as substâncias foram obtidas da VETEC (Rio de Janeiro – Brasil).

Tabela 1: Composição da solução de Krebs-Henseleit e Krebs-Henseleit com 80mM de KCl.

	Krebs-Henseleit	Krebs-Henseleit 80mM de KCl
Sais	Concentração (mM)	Concentração (mM)
NaCl	118,4	43,1
NaHCO₃	25	25
KCl	4,7	80
MgSO₄	1,2	1,2
KH₂PO₄	1,2	1,2
C₆H₁₂O₆	11,1	11,1
CaCl₂	2,5	2,5

Fonte: RODAT-DESPOIX et al., 2007

Para o preparo da solução tampão fosfato (PBS) foram utilizados cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) (Tabela 2).

Tabela 2: Composição da solução de PBS.

Componentes	Concentração (mM)
NaCl	161,0
NaH₂PO₄	1,8
Na₂HPO₄	15,8

4.3 Análise do Efeito do Carvacrol na Redução da Hipertensão Pulmonar

Aferição da Pressão Arterial Pulmonar em Ratos Anestesiados

Após os 28 dias de tratamento com os animais, estes foram submetidos a uma cirurgia para análise da pressão arterial pulmonar (PAP), através da medida da pressão sistólica ventricular direita. Os ratos foram anestesiados para a realização da tricotomia do tórax e intubação via endotraqueal para ventilação mecânica (SCHERMULY et al., 2004). Em seguida o coração foi exposto via toracotomia mediana transesternal para a inserção de um cateter PE-50, conectado ao transdutor de pressão pré-calibrado, no ventrículo direito para aferição da medida (KAMEZAKI et al., 2008). Nesta análise também foi aferida a pressão diastólica ventricular direita e frequência cardíaca. As variações de pressão foram

registradas utilizando o sistema de aquisição de dados *PowerLab ADInstruments* e analisados pelo programa *LabChart Reader*.

4.4 Análise do Índice de Hipertrofia Ventricular Direita

Com os animais eutanasiados, foram retirados o coração e pulmões, os quais foram colocados em placa de petri contendo solução gelada de Krebs-Hesenseit para haver a limpeza dos órgãos. À priori foram retirados os átrios, logo em seguida o ventrículo direito foi separado do ventrículo esquerdo junto com o septo, os quais foram suavemente secos com gaze e levados para a balança analítica para realizar a pesagem individualmente. O índice de hipertrofia ventricular direita foi realizado através da razão entre o peso do ventrículo direito e o ventrículo esquerdo + septo (VD/VE+S) (ZEINEH et al., 2014; ALENCAR et al., 2013).

4.5 Avaliação do Efeito do Carvacrol na Prevenção da Disfunção Endotelial na Hipertensão Pulmonar

Reatividade Vascular

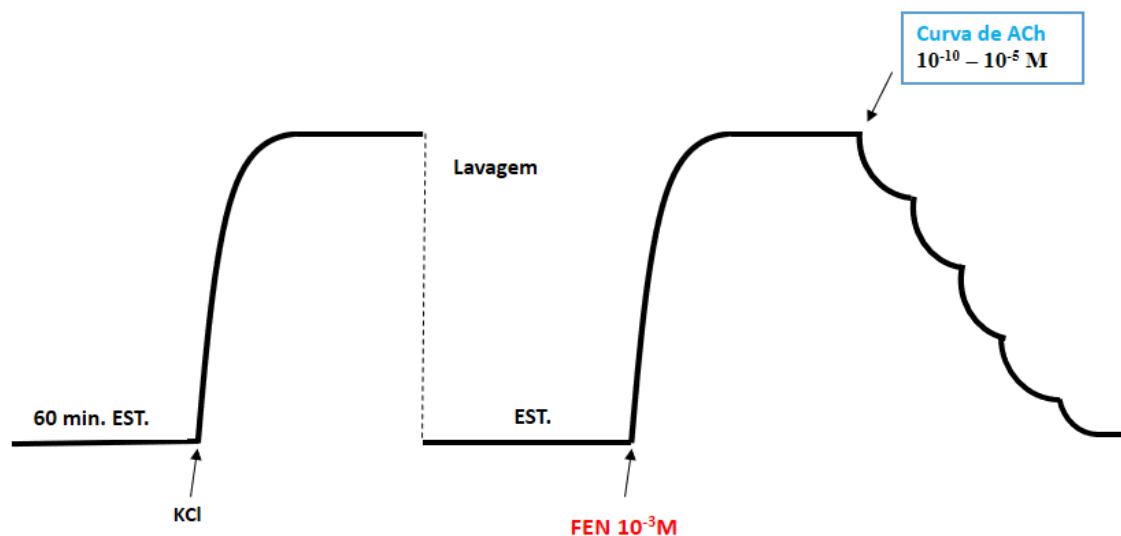
Para verificar o efeito vasorelaxante do carvacrol foi utilizado a análise de reatividade vascular através do banho para órgãos isolados. Nesta análise os ramos extrapulmonares das artérias foram isolados e dissecados de todo tecido perivascular e colocados em placa de petri contendo solução gelada de Krebs-Henseleit gaseificado com mistura de 5% de CO₂ e 95% de O₂.

Posteriormente as artérias pulmonares foram seccionadas em 1-2mm de comprimento, e imersas em cubas para banho de órgãos isolados contendo 10mL de solução de Krebs-Henseleit em temperatura de 37°C, pH 7,4 e gaseificada de modo constante com mistura carbogênica de 5% de CO₂ e 95% de O₂, sendo acopladas ao transdutor de força. Os anéis de artéria pulmonar foram submetidos a uma tensão constante de 1g (CHRISTOU et al., 2012) para estabilização durante 60 minutos, o qual neste período houve a troca da solução de Krebs-Henseleit em intervalos de 15 minutos para evitar a interferência de metabólitos indesejáveis (ALTURA & ALTURA, 1970).

Após a estabilização os anéis foram estimulados com solução despolarizante de potássio (KCl 80mM) para analisar a viabilidade do tecido, posteriormente, as cubas foram lavadas com solução de Krebs-Henseleit até os anéis das artérias pulmonares voltarem a sua tensão basal, 1g. Com a tensão estabelecida, as artérias foram contraídas com concentração submáxima de fenilefrina (10⁻³M) para a realização da curva com concentrações cumulativas e crescentes (10⁻¹⁰ – 10⁻⁵ M) de acetilcolina (ACh) com objetivo de avaliar a disfunção endotelial (Figura 9) (ALENCAR et al., 2013).

Figura 9: Representação esquemática curva concentração resposta de acetilcolina

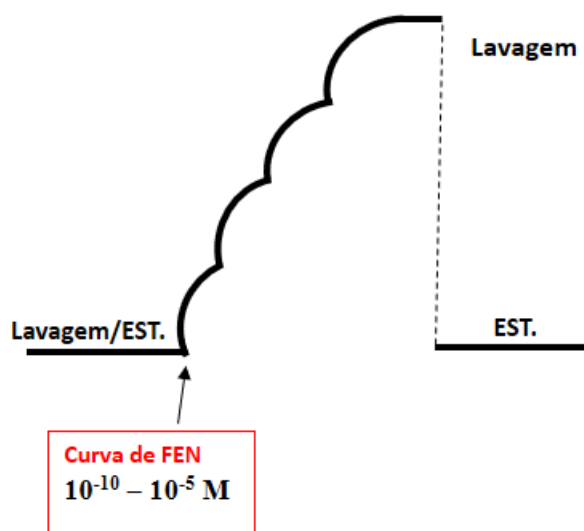
Fonte: Autora do presente trabalho



Após a curva de concentração-efeito de ACh, as cubas foram lavadas com solução de Krebs-Henseleit, posteriormente as artérias foram induzidas à contração por meio da curva concentração-resposta ($10^{-10} - 10^{-5}$ M) frente fenilefrina (FEN) (Figura 10).

Figura 10: Representação esquemática da curva concentração-resposta de fenilefrina.

Fonte: Autora do presente trabalho.

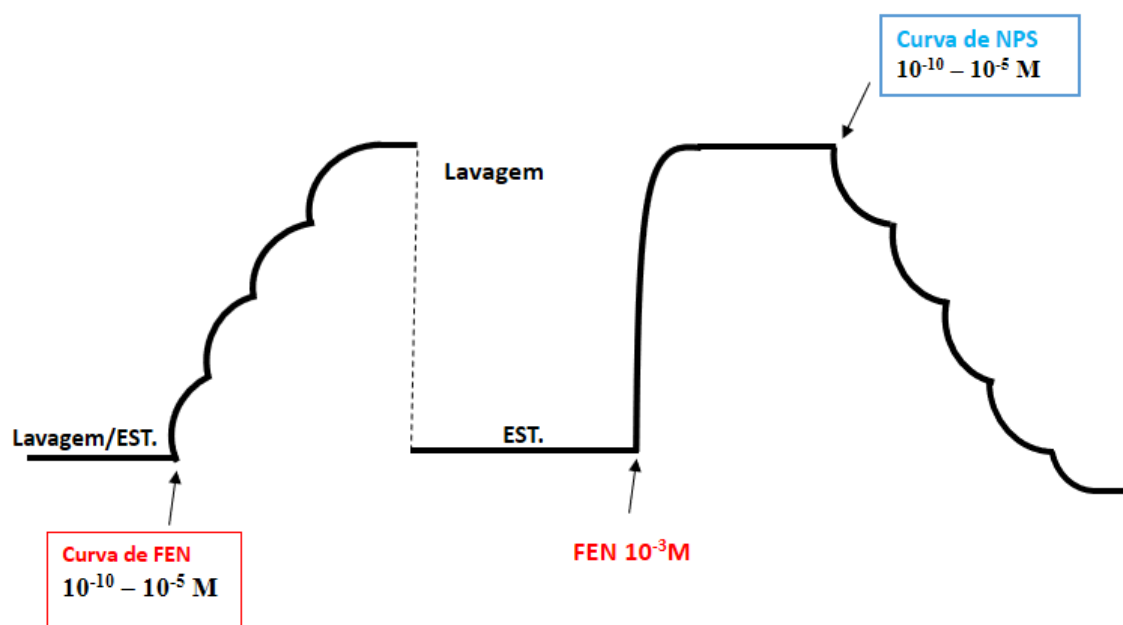


Logo após, as cubas foram novamente lavadas para a volta da tensão basal e estabilização, posteriormente, os anéis foram submetidos a remoção mecânica do endotélio e subsequentemente contraídos com a concentração submáxima de FEN para a

realização da curva concentração-efeito de nitroprussiato de sódio (NPS) ($10^{-10} - 10^{-5}$ M), o qual é um doador de NO independente de endotélio, e avaliar o vasorelaxamento e disfunção vascular (Figura 11).

Figura 11: Representação esquemática da curva concentração-resposta de nitroprussiato de sódio.

Fonte: Autora do presente trabalho.



4.6 Análise Histológica dos Anéis de Artéria Pulmonar

Após a limpeza das artérias extrapulmonares, estas foram cortadas em anéis de 2-3mm de comprimento e inseridas no meio de inclusão para amostras frescas, *Tissue Tek Compound* (OCT), congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em temperatura de -80°C .

Para a realização da análise, as secções do tecido foram feitas a -20°C no criostato (*Cryostat Leica*, Nussloc, Alemanha) com espessura de $14\text{ }\mu\text{m}$, posteriormente as lâminas com os cortes de artéria pulmonar foram inseridas em cubas para coloração de lâminas e hidratadas em álcool com concentrações decrescentes, desde álcool absoluto a álcool 70%.

Logo após, as lâminas foram lavadas em água corrente para a remoção do excesso de álcool e em seguida foram coradas com hematoxilina, passaram por novo processo de lavagem em água corrente e em seguida coradas com eosina. Posteriormente, as lâminas foram submersas em álcool 90% e álcool 95%, e levadas à estufa. Para montagem das lâminas foi utilizado xilol para melhor observação do material, seguido de bálsamo do Canadá para selagem das lâminas, retirando o excesso deste produto, para acabamento e finalização do preparo das lâminas (VIEIRA, 2008).

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada a um microscópio óptico. As imagens foram calibradas no programa *MOTIC PLUS* em

definições específicas conforme as objetivas utilizadas com aumento de 4x, 10x ou 40x. O parâmetro considerado para análise estatística foi a espessura da parede das artérias pulmonares.

4.7 Análises Moleculares

Espécies Reativas de Oxigênio

Para a avaliação da produção de ânions superóxido nos anéis de artéria pulmonar, foi utilizado a sonda DHE (di-hidroetídio), a qual tem como característica difundir-se de forma passiva para o interior da célula e alta reatividade. No interior da célula o DHE é oxidado pelo ânion superóxido, formando seu produto intermediário, 2-OHET⁺ (2-hidroxi-etídio), onde este se intercala com o DNA emitindo uma fluorescência vermelha com excitação máxima de 500nm e emissão de 580nm (WOJTALA et al., 2014).

Para a realização das análises as artérias extrapulmonares foram cortadas em anéis de 2-3mm de comprimento e adicionadas em meio de inclusão para amostras frescas, *Tissue Tek Compound* (OCT), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no -80°C. As secções do tecido foram realizadas a -20°C em criostato (*Cryostat Leica*, Nussloc, Alemanha) com espessura de 14 µm.

As lâminas com os segmentos das artérias foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e posteriormente foram incubadas com 10µM de DHE durante 30min. à 37°C em câmara úmida, ao abrigo de luz (WOJTALA et al., 2014; GROBE et al., 2006). Logo após, estes cortes foram lavados com PBS para retirar o excesso do DHE e levadas de imediato para o microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão). A fluorescência obtida nos grupos foi determinada pela seguinte equação: $\Delta\% \text{ Fluorescência} = (\text{tratado} - \text{controle}) \times 100/\text{controle}$.

4.8 Análises Estatísticas

Os dados das análises foram expressos como média, mais ou menos o erro padrão da média. Na análise das curvas concentração-efeito foram utilizados os valores de $Emax$ calculados a partir da regressão não linear das respostas obtidas.

Foram escolhidos o teste “*T Student*” (não pareado) para a comparação entre dois grupos e análise de variância ANOVA “*one way*” com pós-teste *Tukey* para comparação entre mais de dois grupos. Dados considerados significativos foram com $p < 0,05$. As análises de todos os procedimentos foram calculadas pelo programa estatístico Graph Pad Prism versão 6.0®.

Resultados

5. Resultados

5.1 Efeito do Carvacrol Sobre a Pressão Arterial Pulmonar e Frequência Cardíaca

Nas análises para avaliar o efeito do carvacrol sobre a pressão arterial pulmonar (PAP), foram observadas a pressão sistólica ventricular direita (PSVD) e pressão diastólica ventricular direita (PDVD).

Foi observado na aferição da PSVD que os animais do grupo MCT (37 ± 3 mmHg, $n=4$) tiveram aumento significativo na pressão em comparação ao grupo controle (CTL) (20 ± 2 mmHg, $n=4$) (Gráfico 1). Os animais hipertensos tratados com CRV 50mg/Kg (24 ± 1 mmHg, $n=4$) e SILD (21 ± 4 mmHg, $n=4$) reduziram significativamente a pressão quando comparados ao grupo MCT, em contrapartida, os animais hipertensos tratados com CRV 100mg/Kg (29 ± 2 mmHg, $n=4$) não obtiveram diferença quando comparado ao grupo MCT (Gráfico 1).

Na aferição da PDVD não houve diferença significativa entre os grupos (CTL= 10 ± 1 mmHg, $n=4$; MCT = 8 ± 2 mmHg, $n=4$; MCT + CRV 50 mg/Kg = 9 ± 1 mmHg, $n=4$; MCT + CRV 100 mg/Kg = 9 ± 1 mmHg, $n=4$ mg/Kg; MCT + SILD = 10 ± 1 mmHg, $n=4$) (Gráfico 2), consequentemente, podemos observar que os animais induzidos a HP pela monocrotalina apresentam alterações significativas apenas na PSVD. A frequência cardíaca também foi avaliada, onde foi visto que nos animais hipertensos tratados com SILD (127 ± 8 bpm, $n=4$), houve uma diminuição da frequência cardíaca quando comparados ao grupo MCT (176 ± 6 bpm, $n=4$); os outros grupos não apresentaram diferença significativa (CTL= 121 ± 26 bpm, $n=4$; MCT + CRV 50 mg/Kg = 162 ± 29 bpm, $n=4$; MCT + CRV 100 mg/Kg = 173 ± 19 bpm, $n=4$) (Gráfico 3).

Gráfico 1: Representação gráfica da pressão sistólica ventricular direita de ratos com HP induzidos por monocrotalina. Grupos: CTL (controle normotenso, $n=4$); MCT (controle com HP, $n=4$); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, $n=4$); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, $n=4$) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafil, $n=4$). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p<0,05$ * vs CTL; # vs MCT.

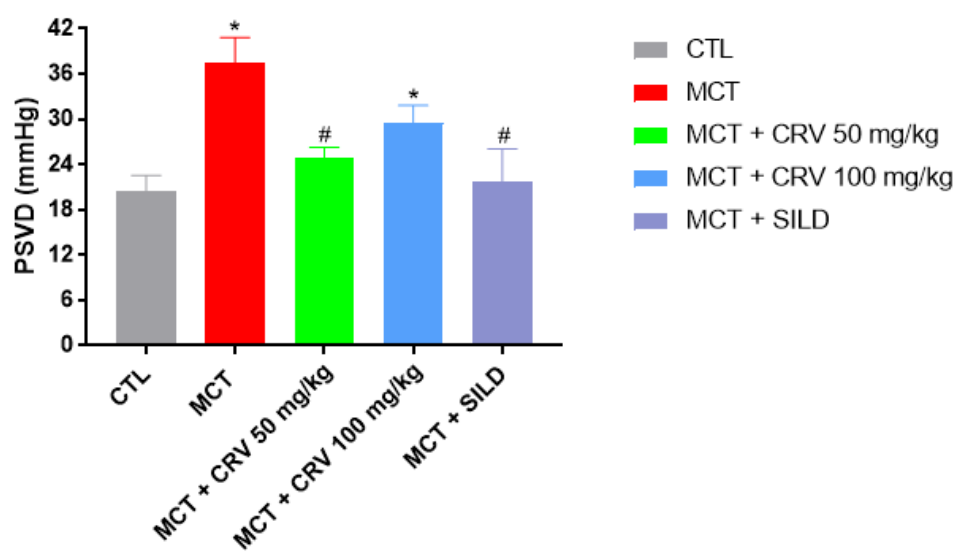


Gráfico 2: Representação gráfica da pressão diastólica ventricular direita de ratos com HP induzidos por monocrotalina. Grupos: CTL (controle normotenso, n= 4); MCT (controle com HP, n= 4); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n= 4); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n= 4) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafila, n= 4). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p < 0,05$. Não houve diferença significativa entre os grupos.

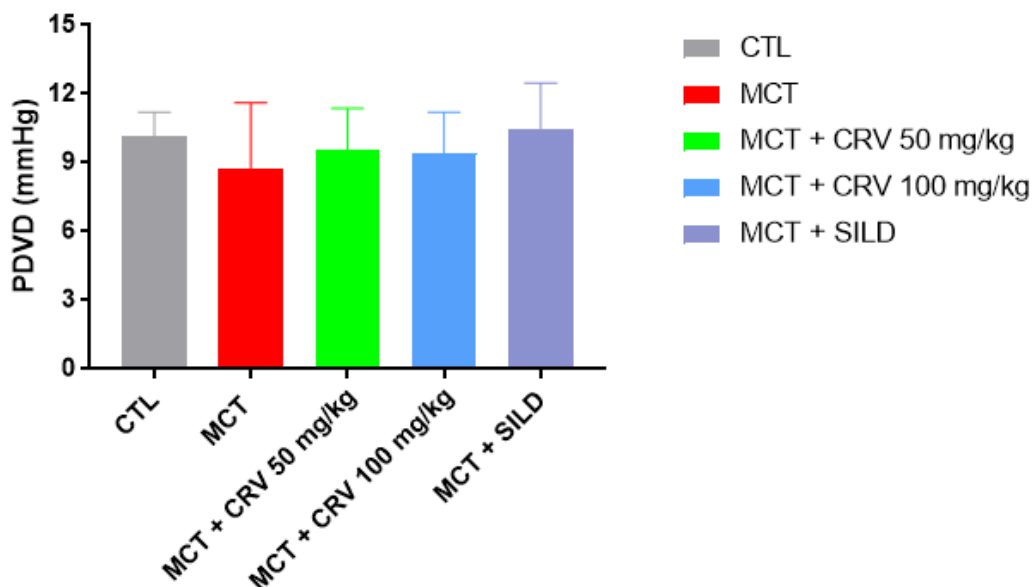
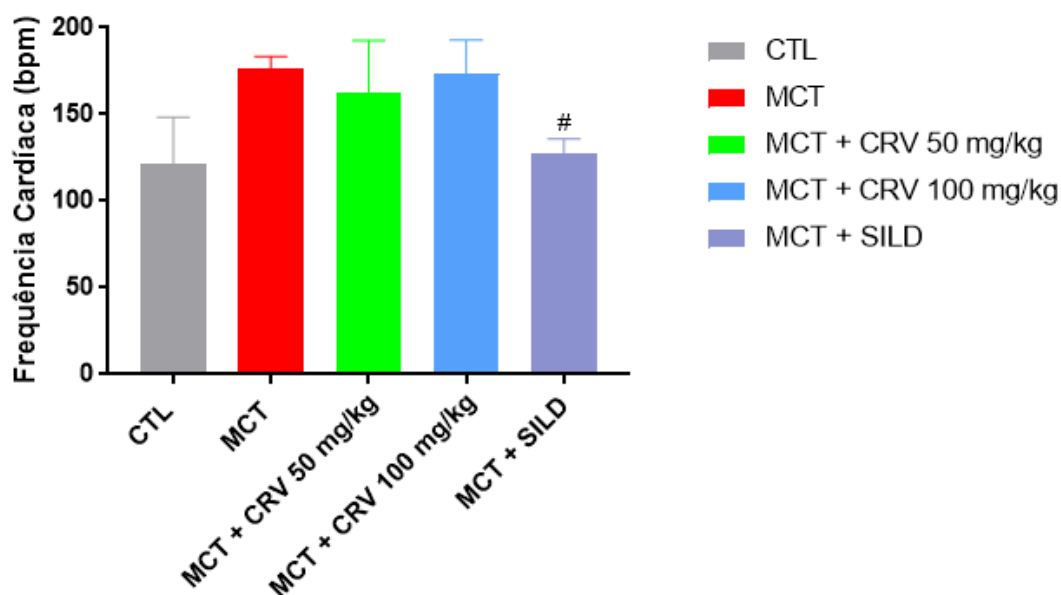


Gráfico 3: Representação gráfica da frequência cardíaca de ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Grupos: CTL (controle normotenso, n= 4); MCT (controle com HP, n= 4); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n= 4); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n= 4) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafila, n= 4). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p < 0,05$ # vs MCT.

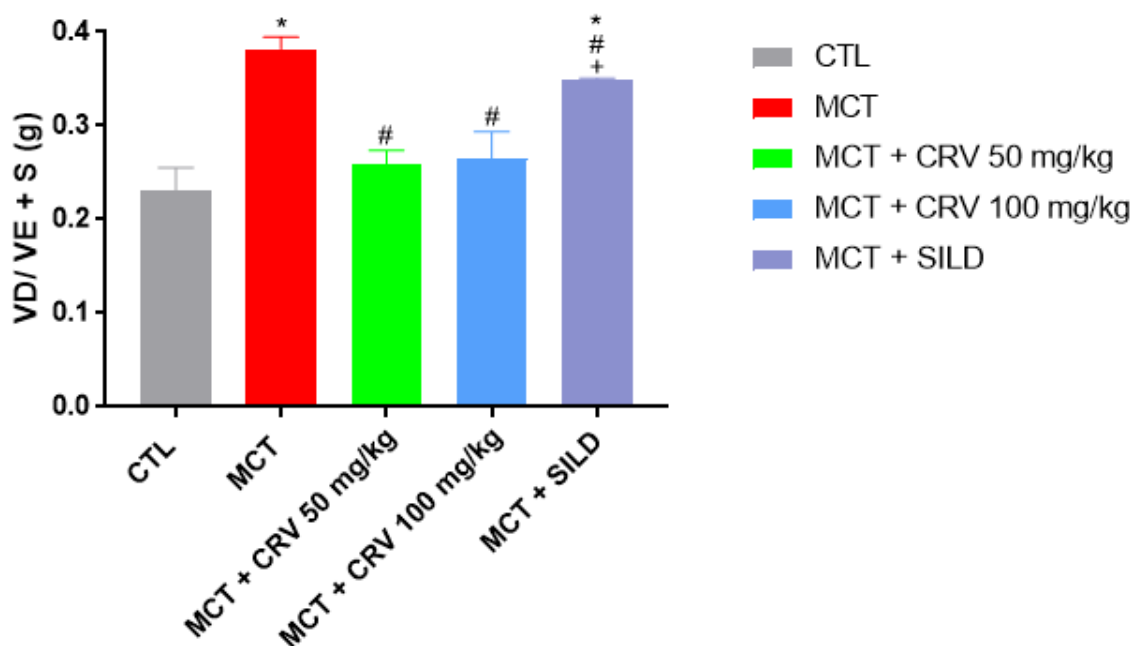


5.2 Efeito do Carvacrol sobre a Hipertrofia Ventricular Direita

Após a aferição da PAP os animais foram eutanasiados para efetuar a remoção dos órgãos, dentre eles o coração, o qual o peso individual dos ventrículos direito e esquerdo + septo, foram utilizados para avaliação da hipertrofia ventricular direita (HVD).

Nesta análise os animais hipertensos (MCT) apresentaram elevação significativa na hipertrofia ventricular direita ($0,38 \pm 0,02$ g, $n=4$) quando comparados ao grupo CTL ($0,23 \pm 0,04$ g, $n=4$) (Gráfico 4). Todos os animais hipertensos tratados reduziram a HVD, sendo que os grupos MCT + CRV 50mg/Kg ($0,26 \pm 0,02$ g, $n=4$) e MCT + CRV 100mg/Kg ($0,26 \pm 0,05$ g, $n=4$) obtiveram maior redução quando comparados ao grupo MCT + SILD ($0,34 \pm 0,003$ g, $n=4$) (Gráfico 4).

Gráfico 4: Representação gráfica da hipertrofia ventricular direita de ratos com HP induzidos por monocrotalina. Grupos: CTL (controle normotenso, $n= 4$); MCT (controle com HP, $n= 4$); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, $n= 4$); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, $n= 4$) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafil, $n= 4$). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p<0,05$ * vs CTL; # vs MCT; + vs Animais tratados.



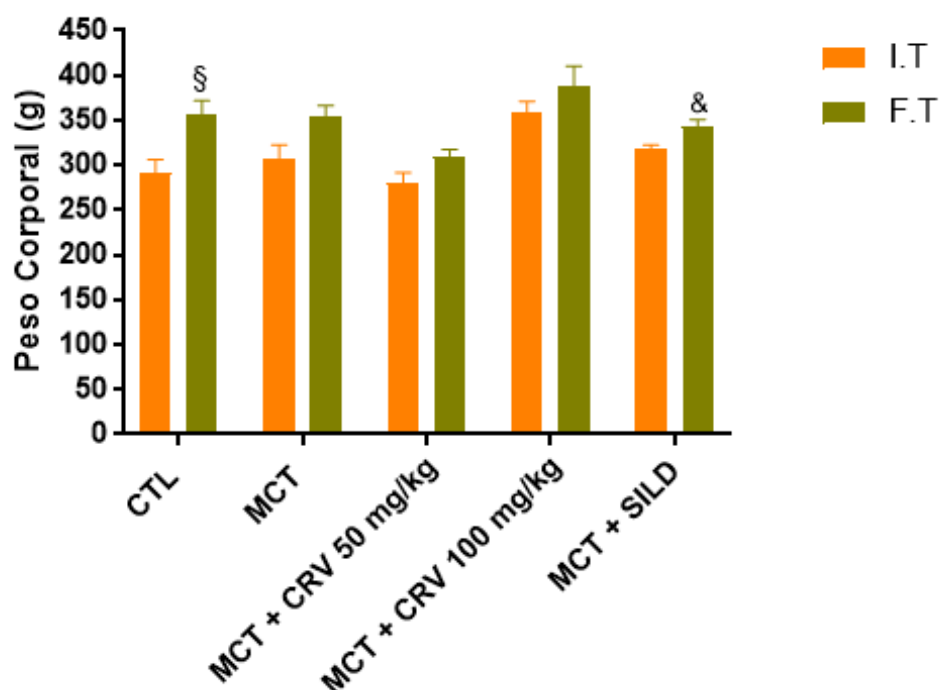
5.3 Análise do Peso Corporal dos Modelos Experimentais

Quanto ao peso corporal, os dados foram obtidos a partir das pesagens realizadas no início (I.T) e final do tratamento (F.T). Foi observado que os animais de todos os grupos não apresentaram redução de peso corporal. Não houve diferença significativa entre o início e final do tratamento, respectivamente, nos grupos MCT (306 ± 16 g, $n= 4$; 353 ± 12 g, $n= 4$); MCT + CRV 50 mg/Kg (280 ± 11 g, $n= 4$; 309 ± 7 g, $n= 4$) e MCT + CRV 100 mg/Kg (358 ± 13 g, $n= 4$; 387 ± 22 , $n= 4$), como observado no gráfico 5. Os animais

pertencentes aos grupos CTL ($292 \pm 14\text{g}$, $n= 4$; $355 \pm 16\text{g}$, $n= 4$) e MCT + SILD ($318 \pm 3\text{g}$, $n= 4$; $343 \pm 7\text{g}$, $n= 4$) tiveram aumento no peso corporal de forma sigficativa entre o início e fim do tratamento, respectivamente (Gráfico 5).

Gráfico 5: Representação gráfica do peso corporal dos ratos com HP induzidos por monocrotalina.

Grupos: CTL (controle normotenso, $n= 4$); MCT (controle com HP, $n= 4$); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, $n= 4$); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, $n= 4$) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafil, $n= 4$). Os animais foram pesados no início (I.T) e final (F.T) do tratamento. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p<0,05$ § vs CTL F.T; & vs MCT + SILD F.T.



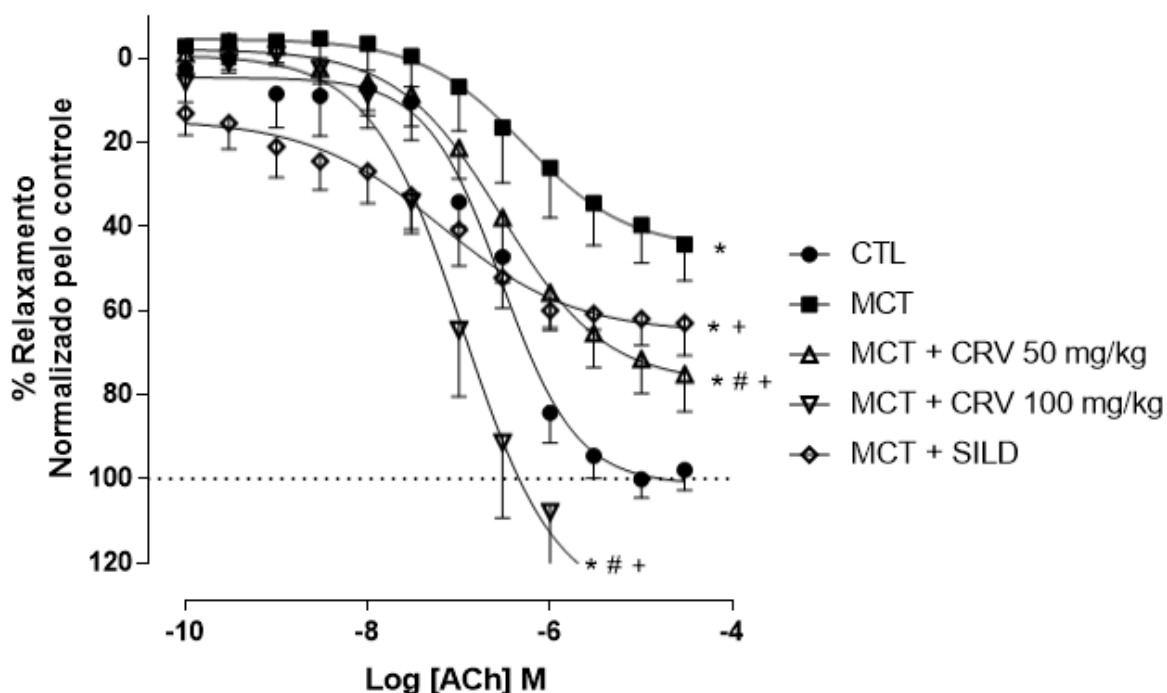
5.4 Efeito do Tratamento com Carvacrol Sobre a Reatividade Vascular de Anéis de Artéria Pulmonar de Ratos com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina

Após a limpeza das artérias pulmonares, estas foram seccionadas e inseridas no banho para órgãos isolados; posterior ao período de estabilização durante 60 minutos, foi avaliado a disfunção endotelial através da curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) após de uma pré-contracção frente fenilefrina. As análises mostraram que o grupo MCT apresentou porcentagem de relaxamento significativamente reduzida ($E_{\text{máx}} = 44 \pm 8\%$, $n= 6$) quando comparado ao grupo CTL ($E_{\text{máx}} = 100 \pm 4\%$, $n=6$) (Gráfico 6).

Os grupos MCT + CRV 50mg/Kg ($E_{\text{máx}} = 75 \pm 8\%$, $n= 7$) e MCT + CRV 100mg/Kg ($E_{\text{máx}} = 130 \pm 13\%$, $n= 5$) obtiveram maior porcentagem de relaxamento quando comparados ao grupo MCT, ademais, o tratamento com CRV 100mg/Kg apresentou

melhor resposta ao relaxamento em comparação ao grupo CTL, estes dados sugerem que o carvacrol atua no reestabelecimento da função endotelial do vaso. O grupo MCT + SILD ($Emáx = 62 \pm 7\%$, $n = 5$) não apresentou melhora significativa na resposta vasodilatadora frente à ACh quando comparado ao grupo MCT (Gráfico 6).

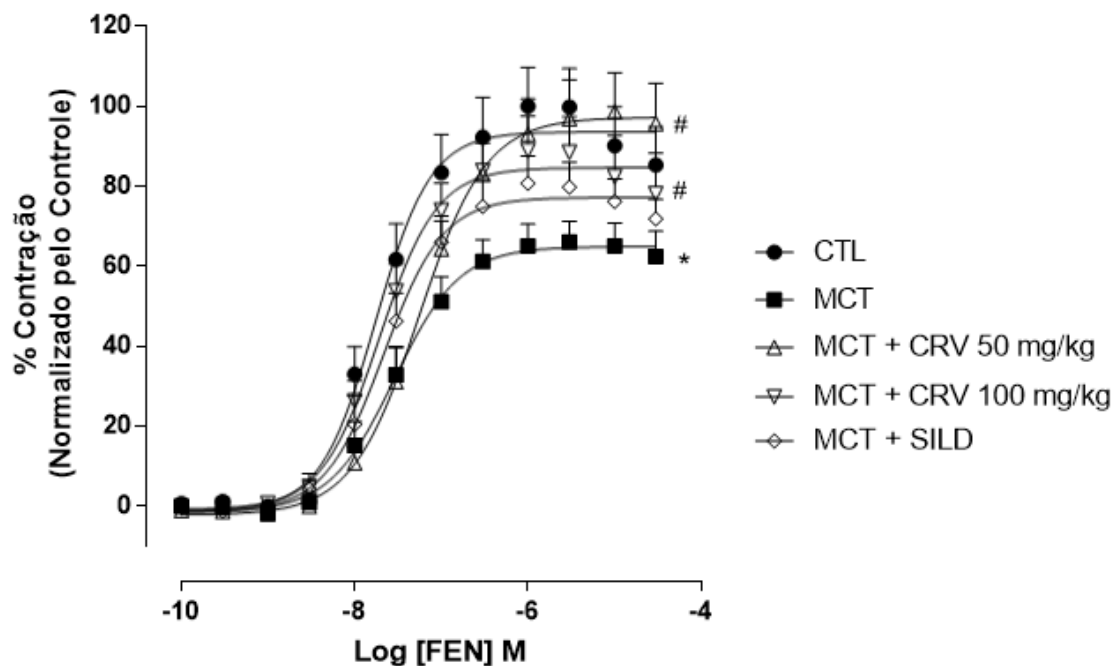
Gráfico 6: Representação gráfica da curva concentração-resposta frente ACh de seções de artéria pulmonar pré-contraídas com FEN de ratos com HP induzidos por monocrotalina. Grupos: CTL (controle normotenso, $n = 6$); MCT (controle com HP, $n = 6$); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, $n = 7$); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, $n = 5$) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafil, $n = 5$). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p < 0,05$
* vs CTL; # vs MCT; + vs Animais Tratados.



Posteriormente foi avaliada a resposta das artérias pulmonares ao efeito vasoconstritor frente à fenilefrina (FEN). A curva concentração-resposta de artérias pulmonares mostraram que o grupo MCT apresentou menor resposta vasoconstritora para a FEN ($Emáx 66 \pm 5\%$, $n = 6$) quando comparado ao grupo CTL ($Emáx 100 \pm 9\%$, $n = 6$) (Gráfico 7).

Os grupos MCT + CRV 50 mg/Kg ($Emáx 98 \pm 9\%$, $n = 6$) MCT + CRV 100mg/Kg ($Emáx 88 \pm 8\%$, $n = 6$) e MCT + SILD ($Emáx 80 \pm 6\%$, $n = 6$) apresentaram aumento na resposta à contratilidade, todavia, apenas os grupos MCT + CRV 50mg/Kg e MCT + CRV 100mg/Kg apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo MCT (Gráfico 7).

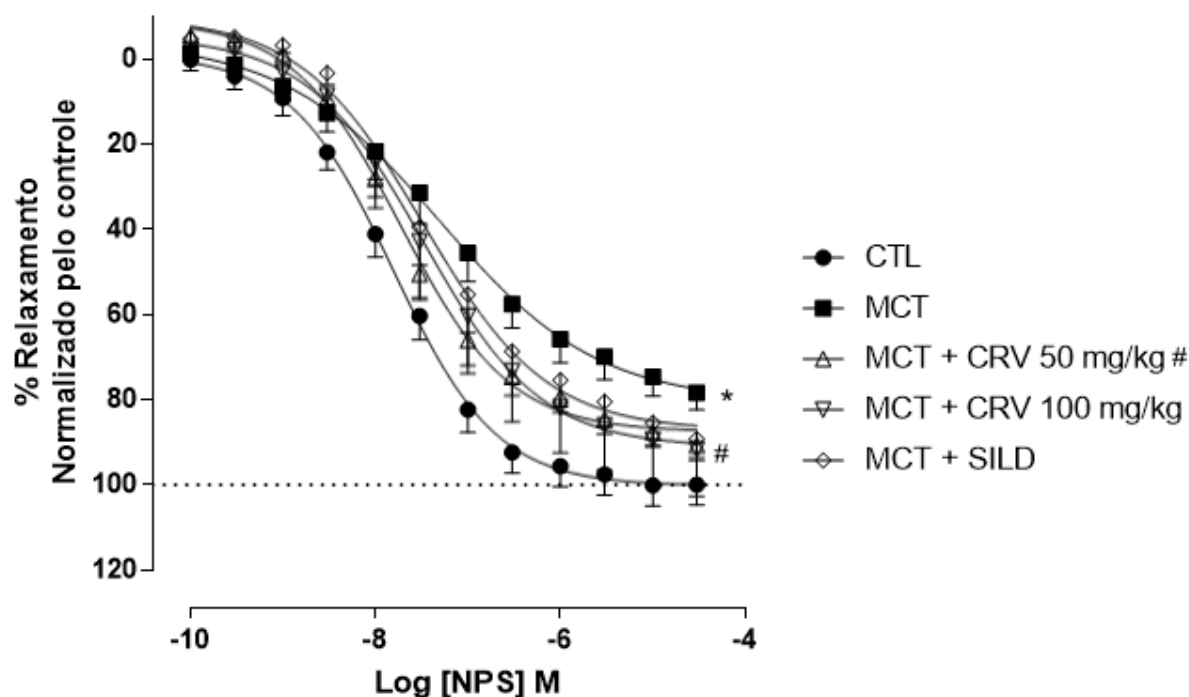
Gráfico 7: Representação gráfica da curva concentração-resposta frente FEN de secções de artéria pulmonar de ratos com HP induzidos por monocrotalina. Grupos: CTL (controle normotenso, n= 6); MCT (controle com HP, n= 6); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n= 6); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n= 6) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafil, n= 6). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p < 0,05$ * vs CTL; # vs MCT.



Após a análise da curva concentração-resposta das artérias pulmonares frente à FEN, foi avaliado a curva concentração-resposta ao vasorelaxamento desencadeado pelo nitroprussiato de sódio (NPS), através de uma pré-contracção com FEN.

Os dados observados mostraram que o grupo MCT ($Emáx 78 \pm 3\%$, $n=8$) apresentou menor porcentagem de relaxamento quando comparados ao grupo CTL ($Emáx 100 \pm 4\%$, $n=8$) (Gráfico 8). Os grupos MCT + CRV 50mg/Kg ($Emáx 90 \pm 2\%$, $n=8$), MCT + CRV 100mg/Kg ($Emáx 91 \pm 10\%$, $n= 8$) e MCT + SILD ($Emáx 89 \pm 4\%$, $n=8$) aumentaram sua resposta vasorelaxante, entretanto, apenas o grupo MCT + CRV 50mg/Kg apresentou diferença significativa com o grupo MCT (Gráfico 8).

Gráfico 8: Representação gráfica da curva concentração-resposta frente NPS de secções de artéria pulmonar pré-contraídas com FEN de ratos com HP induzidos por monocrotalina. Grupos: CTL (controle normotenso, n= 8); MCT (controle com HP, n= 8); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n= 8); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n= 8) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafila, n= 8). Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste T *student*, $p < 0,05$ * vs CTL; # vs MCT.



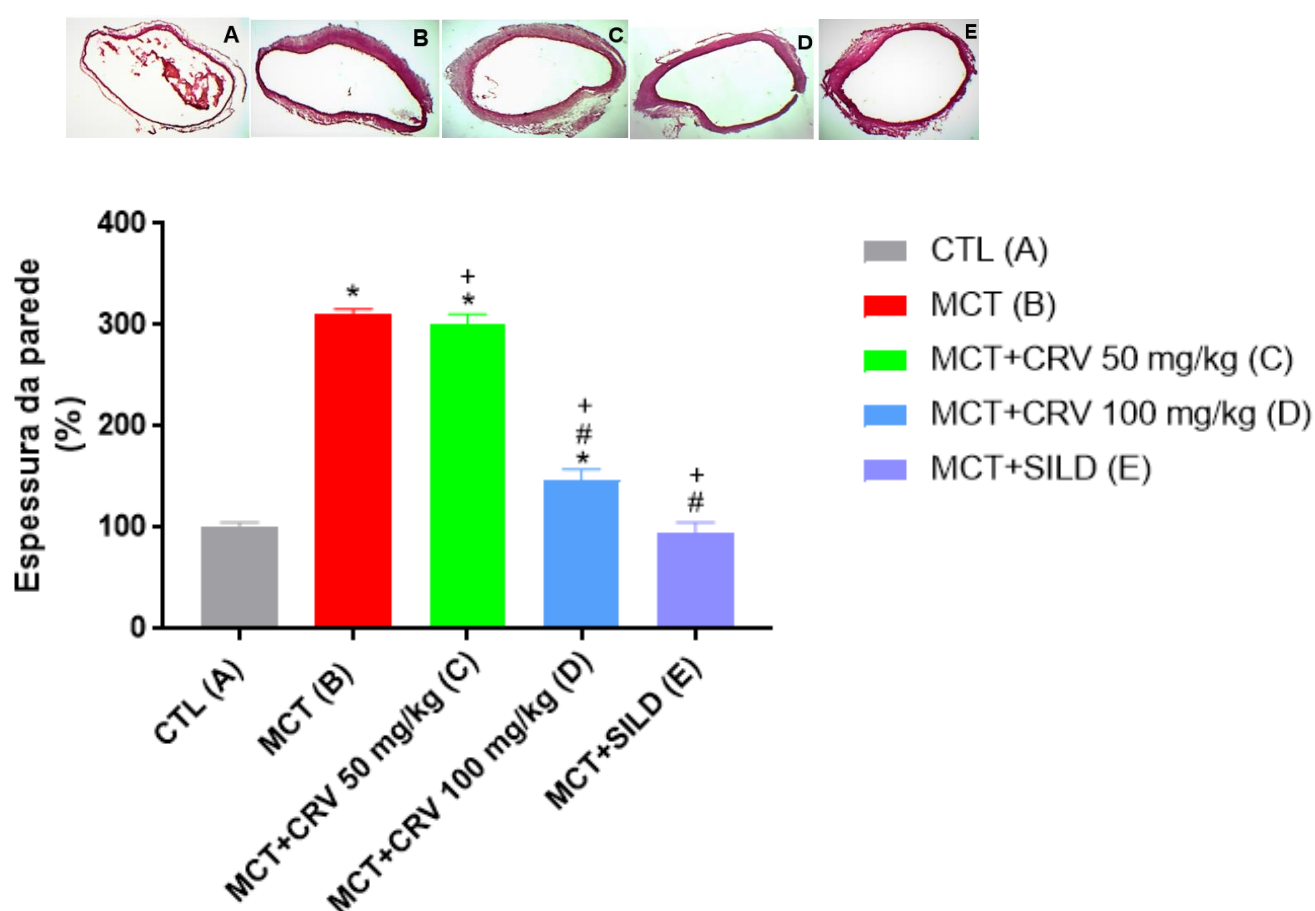
5.5 Efeito do Carvacrol no Remodelamento Vascular Pulmonar

As lâminas contendo os cortes histológicos de artéria pulmonar dos grupos experimentais foram analisadas pela coloração hematoxilina-eosina, onde foi observado que o grupo CTL ($100 \pm 5,2$ %, n = 5) apresentou parede arterial delgada com as túnicas íntima, média e adventícia íntegras e sem alteração morfológica (Figura 12). O grupo MCT ($310 \pm 5,2$ %, n = 5) apresentou espessamento da parede do vaso por aumento da túnica média devido a hipertrofia e hiperplasia das células musculares lisas e aumento de fibroblastos; as túnicas íntimas e adventícia se mantiveram sem alteração morfológica (Figura 12).

Os cortes de artéria pulmonar do grupo MCT + CRV 50mg/Kg ($300 \pm 10,5$ %, n = 5) apresentou parede arterial pulmonar de mesmo aspecto morfológico de espessamento observado no grupo MCT (Figura 12), entretanto o número de células musculares lisas diminuiu, conservando o aumento no número de fibroblastos. Nos grupos MCT + CRV 100mg/Kg ($147 \pm 10,5$ %, n = 5) e MCT + SILD ($94 \pm 10,5$ %, n = 5) (Figura 12) foi observado uma diminuição da espessura da parede arterial pulmonar com diminuição da hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas e do número de fibroblastos, sendo

que o grupo MCT + SILD apresentou diminuição significativa com reconstituição das lâminas elásticas da túnica média.

Figura 12: Análise do remodelamento vascular pulmonar em artérias pulmonares de ratos com HP induzidos por monocrotalina. As análises foram obtidas através de cortes de artéria pulmonar as quais foram coradas com hematoxilina e eosina. Grupos: CTL (controle normotenso, n= 5) **(A)**; MCT (controle com HP, n= 5) **(B)**; MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n= 5) **(C)**; MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n= 5) **(D)** e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafil, n= 5) **(E)**. **(A)** Objetiva x40, A.T. x 400, área 150 μm . **(B)**, **(C)**, **(D)** e **(E)**, objetiva x10, A.T. x100, área 600 μm . Representação gráfica da análise histológica: os dados estão representados como média da porcentagem da espessura da parede da artéria pulmonar $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste Anova *one way*, seguido de teste *Tukey*, $p < 0,05$ * vs CTL; # vs MCT; + vs Animais tratados.



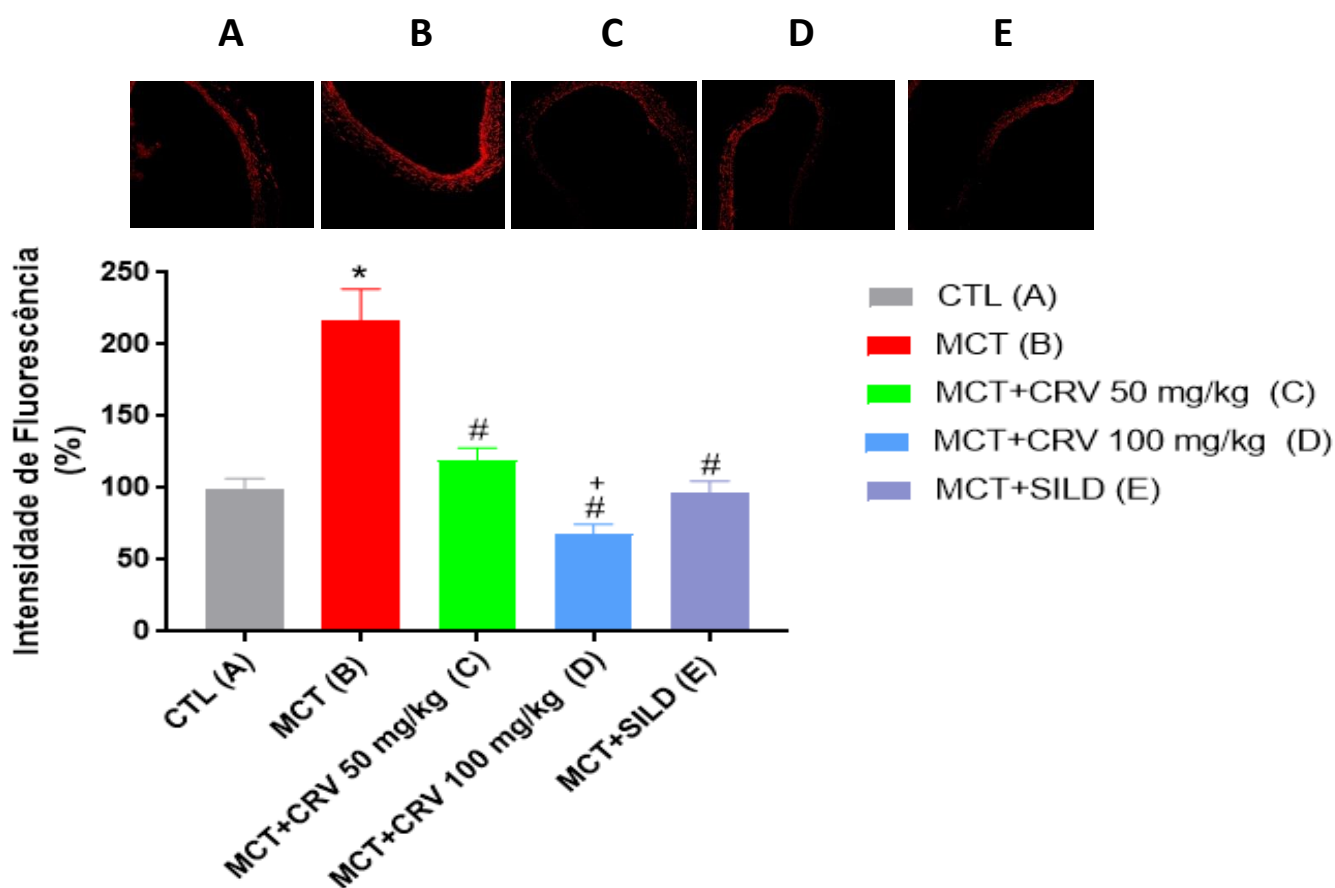
5.6 Efeito do Carvacrol Sobre o Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado através da técnica de DHE, utilizada para análise de ROS, principalmente o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$). Foi observado que o grupo MCT ($216 \pm 22\%$, n= 5) apresentou maior intensidade de fluorescência basal em comparação ao grupo CTL ($100 \pm 6\%$, n= 5), como pode ser observado na figura 13, demonstrando que a HP

de fato gera um desequilíbrio do estado redox, favorecendo a elevação de ROS e consequentemente ao estresse oxidativo.

Os grupos MCT + CRV 50 mg/Kg ($119 \pm 8\%$, $n=5$) e MCT + CRV 100 mg/Kg ($68 \pm 6\%$, $n=5$) mostraram redução significativa da intensidade de fluorescência quando comparados ao grupo MCT (Figura 13), sendo que o grupo MCT + CRV 100 mg/Kg obteve maior redução do estresse oxidativo, de forma significativa quando comparado aos grupos MCT + CRV 50 mg/Kg e MCT + SILD ($96 \pm 7\%$, $n=5$) e também ao próprio grupo CTL, como observado na figura 13.

Figura 13: Análise do estresse oxidativo em ratos com hipertensão pulmonar induzidos por monocrotalina. As análises foram obtidas através de cortes de artéria pulmonar (objetiva 20X) as quais por meio da sonda DHE foi emitida fluorescência vermelha ao entrar em contato com o $O_2^{\cdot -}$. Grupos: CTL (controle normotenso, $n=5$); MCT (controle com HP, $n=5$); MCT + CRV 50mg/Kg (hipertensos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, $n=5$); MCT + CRV 100mg/Kg (hipertensos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, $n=5$) e MCT + SILD (hipertensos tratados com 50mg/Kg de sildenafil, $n=5$). Para a representação gráfica da análise de ROS, os dados estão representados como média da porcentagem de fluorescência $\pm$ erro padrão da média. Foram analisados utilizando o teste Anova *one way*, seguido de teste *Tukey*, $p < 0,05$ * vs CTL; # vs MCT; + vs Animais tratados.



Discussão

6. Discussão

O presente estudo teve como finalidade avaliar os efeitos do carvacrol na hipertensão pulmonar de ratos induzido por monocrotalina. A HP tem sido caracterizada como uma doença crônica, rara e progressiva, que acomete 15 indivíduos a cada 1 milhão de pessoas (SUEN et al., 2016; GALIÈ et al., 2018) e, na maioria dos casos, o início do desenvolvimento da doença ocorre de forma assintomática, todavia, posteriormente, começam a apresentar sintomas como fadiga, dispneia e exaustão (HOEPER et al., 2017).

A fisiopatologia é caracterizada por três fatores importantes que são: aumento da resistência vascular pulmonar, hipertrofia ventricular direita e aumento da pressão sistólica ventricular direita (ALENCAR et al., 2013). Os medicamentos presentes no mercado para o tratamento da HP, como os inibidores da fosfodiesterase-5, inibidores dos receptores de endotelina-1, diuréticos e prostanóides (MONTANI et al., 2014), possuem sítios de ação e mecanismos moleculares diferentes, sendo possível a administração em conjunto, não obstante, medicamentos mais eficazes para esta patologia ainda são urgentemente necessários, tendo em vista que, os que já são utilizados para o tratamento possui pouco efeito sobre o remodelamento vascular.

O carvacrol, é um monoterpene fenólico proveniente de óleos essenciais presentes em algumas plantas aromáticas, como o *Origanum dictamus*, conhecido popularmente como orégano. Atualmente o carvacrol vem ganhando espaço na pesquisa científica por conter propriedades importantes para o tratamento de diversas patologias, este monoterpene possui atividade antifúngica, anticancerígena, antibacteriana, ansiolítica, antiagregante plaquetário e entre outros (SUNTRES et al., 2014; FACHINI-QUEIROZ et al., 2012; CHEN et al., 2015).

Em nosso laboratório o carvacrol mostrou-se uma substância promissora para o tratamento da hipertensão arterial, demonstrando efeitos hipotensores e bradicárdicos nos ratos hipertensos assim como nos normotensos não anestesiados, além de favorecer o vasorelaxamento em aorta (DANTAS, 2014). A diminuição da hipertensão arterial também foi evidenciada no trabalho de GONÇALVES (2018) que também demonstrou que o tratamento com o carvacrol melhorou a disfunção erétil.

Dentre as propriedades que o carvacrol possui estão a atividade vasorelaxante, anti-inflamatória e anti-oxidante, as quais são importantes para a busca por melhores tratamentos para a HP, sendo assim, estes dados sobre o carvacrol, corroboraram para escolhermos este monoterpene para ser utilizado como tratamento em ratos com HP induzidos por monocrotalina. Consequentemente, investigamos se o carvacrol é uma substância promissora para atenuar a pressão arterial pulmonar, hipertrofia ventricular direita, disfunção endotelial, assim como, avaliar sua capacidade na diminuição do remodelamento vascular pulmonar e estresse oxidativo.

A análise da pressão arterial pulmonar mostrou que o grupo MCT apresentou aumento significativo na pressão sistólica ventricular direita, quando comparado ao grupo controle, demonstrando, que a monocrotalina, um alcaloide pirrolizidínico, induziu HP nos ratos.

Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de HENRIQUES-COELHO et al. (2008); LEE et al. (2018); CSISZAR et al. (2009); ZEINEH et al. (2014); MA et al. (2011); DE MENDONÇA et al. (2017); e JÚNIOR (2011), mostrando que a monocrotalina desencadeia elevação da pressão arterial pulmonar.

A dosagem de 50mg/Kg de carvacrol foi capaz de atenuar a pressão sistólica ventricular direita, chegando a valores próximos ao grupo controle, assim como o sildenafil, medicamento utilizado para o tratamento da HP em humanos, todavia esta redução não foi observada no grupo dos animais hipertensos tratados com CRV 100mg/Kg, isto possivelmente pode ser decorrente de que a dosagem máxima para obter o efeito hipotensor arterial pulmonar ocorra em 50mg/Kg.

Os resultados obtidos da análise da hipertrofia ventricular direita (HVD), realizada pela razão entre VD/VE+S, corroboram com os dados obtidos da pressão arterial pulmonar. Foi visto que o grupo MCT apresentou um aumento da razão VD/VE+S, quando comparado ao grupo CTL, confirmando, portanto, a HVD; estes dados estão de acordo com os trabalhos de MAM et al. (2010); CHRISTOU et al. (2012); ALENCAR et al. (2013) e ZAPATA-SUDO et al. (2012) que também observaram HVD nos animais induzidos à HP por monocrotalina.

Em nossos estudos os animais induzidos à HP tratados via oral com CRV 50mg/Kg e CRV 100mg/Kg atenuaram significativamente a HVD quando comparados ao grupo MCT, além disso, ambas as dosagens foram mais eficazes quando comparados aos animais tratados com sildenafil. O trabalho de ZHANG et al. (2015) o qual, objetivou avaliar o carvacrol na HP em modelo de hipóxia, também observou redução na HVD.

Devido à elevação da resistência vascular e pressão arterial pulmonar ocorre um aumento da pós-carga do ventrículo direito, conseqüentemente há uma dilatação deste ventrículo, aumento da espessura da parede, hipertrofia de cardiomiócitos e deposição de matriz extracelular. Estas mudanças ocorrem com o intuito de manter o débito cardíaco, e inicialmente, é considerada como mudanças adaptativas que melhoram a contratilidade (VISWANATHAN et al., 2018; SUTENDRA & MICHELAKIS, 2014), todavia, com a progressão da doença, esta contínua adaptação, transforma-se em um remodelamento mal adaptativo em decorrência de insuficiente angiogênese, excessiva inflamação (DE MARCO et al., 2010) e fibrose (OKADA et al., 2009), o que desencadeia a insuficiência ventricular direita.

A insuficiência ventricular direita, por sua vez, é caracterizada pela redução da perfusão miocárdica e isquemia, contínua dilatação do ventrículo direito (NOORDEGRAAF et al., 2017), aumento do volume diastólico final, redução do débito cardíaco assim como do volume sistólico. As alterações do ventrículo direito podem ser decorrentes da sinalização neuro-hormonal, como por exemplo a ação da angiotensina II, aldosterona e endotelina-1, assim como de peptídeos natriuréticos, estresse oxidativo e inflamação (DE MARCO et al., 2010). Portanto, avaliar a hipertrofia ventricular direita é de suma importância pois faz parte da caracterização da HP.

Em nosso estudo também avaliamos os efeitos dos agentes vasoconstritor, FEN, e vasorelaxantes (ACh e NPS), através das curvas concentração-resposta nas secções de artérias pulmonares extraídas dos modelos animais induzidos à HP por meio da monocrotalina, assim como dos animais controle (saudáveis). À priori avaliamos a disfunção endotelial por meio do agente vasorelaxante, acetilcolina (ACh).

A ACh, no sistema cardiovascular, promove redução da frequência cardíaca, redução da força de contração miocárdica e diminuição da velocidade de condução dos tecidos nos nodos sinoatrial e atrioventricular (CABANILLAS, 2006). Ela é um agente vasoativo colinérgico, que favorece ao vasorelaxamento, pois corrobora para a ativação da eNOS fazendo com que o NO seja liberado para as células musculares lisas e área luminal, consequentemente, o NO agora presente nas células musculares lisas, ativa a guanilil ciclase solúvel, que por sua vez, acarreta na formação de GMP cíclico (guanilina monofosfatocíclico), por meio da transformação de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc. Este GMPc por sua vez, apresenta-se como um segundo mensageiro favorecendo ao relaxamento do vaso através da diminuição da entrada de Ca^{2+} para o interior da célula, assim como a inibição de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (DUSSE et al., 2003; RAPOPORT & MURAD, 1983). O óxido nítrico (NO), por sua vez, é um radical livre e possui importante papel na regulação fisiológica do sistema cardiovascular (ZHAO et al., 2015), pois controla a pressão arterial e fluxo sanguíneo local, assim como limita a adesão e agregação plaquetária (RANG & DALE, 2012). Ele é produzido a partir da L-arginina por meio da óxido nítrico sintase (NOS), a qual a NOS possui três tipos de isoformas, que são: iNOS (induzível), nNOs (neuronal) e eNOS (endotelial) (RUDOLPH & FREEMAN, 2009), sendo esta última estrategicamente localizada nas cavéolas das células endoteliais (DUSSE et al., 2003), embora também seja encontrada em osteoblastos, osteoclastos assim como em miócitos cardíacos (RANG & DALE, 2012).

Neste trabalho observamos que a curva concentração-resposta à ACh nas artérias pulmonares dos animais pertencentes ao grupo MCT apresentou redução na porcentagem de relaxamento, em comparação com o grupo CTL, demonstrando que as artérias do grupo MCT apresentam diminuição da capacidade de relaxamento frente à ACh. Outros trabalhos presentes na literatura científica também demonstraram este resultado como a pesquisa de CHRISTOU et al. (2012); MAM et al. (2010); ALENCAR et al. (2013); CSISZAR et al. (2009); PAFFETT et al. (2012); CHRISTOU et al. (2018); e KAZAMA et al. (2014), onde este último, por sua vez, utilizou para a reatividade artérias intrapulmonares e noradrenalina como agente contracturante.

Os tratamentos com 50mg/Kg e 100mg/Kg de carvacrol melhoraram a capacidade de resposta ao relaxamento frente ACh, demonstrando que o carvacrol é uma substância promissora para a atenuação da disfunção endotelial provenientes na HP. Em contrapartida, o tratamento com sildenafil não demonstrou eficácia.

Após a curva concentração-resposta de ACh, foi realizada a curva concentração-resposta frente fenilefrina (FEN). O cloridrato de fenilefrina é um ativador seletivo dos receptores α -1 adrenérgicos, seu efeito vasoconstritor é proveniente da ativação da fosfolipase C, aumentando a quantidade de inositol trifostato e diacilglicerol, o qual

acarreta na liberação de Ca^{2+} intracelular, gerando a contratilidade do vaso (CABANILLAS, 2006).

Em nossos estudos observamos que os anéis das artérias pulmonares do grupo MCT, obtiveram porcentagem de contração frente FEN significativamente reduzida quando comparados ao grupo CTL; resultados semelhantes foram vistos nos trabalhos de CHRISTOU et al. (2012); CHRISTOU et al. (2018) e MAM et al. (2010). SAUVAGEAU et al. (2009), também obteve resultados semelhantes ao nosso, divergindo apenas na escolha do agente contracturante, neste caso foi utilizado a ET-1. Em contrapartida no trabalho de BILLAUD et al. (2011), ao avaliar o papel das conexinas na reatividade foi demonstrado que a curva concentração- resposta frente FEN foi elevada nos animais com hipertensão pulmonar, possivelmente este resultado pode ser devido a diferentes condições experimentais ou diferente preparação vascular.

Em nossos estudos os tratamentos com CRV 50mg/Kg e CRV 100mg/Kg melhoraram a capacidade de resposta do vaso à FEN, em contrapartida, as secções das artérias pulmonares de ratos tratados com sildenafil não obtiveram resultados significativos. Posterior as análises frente FEN, foi realizada a curva concentração-resposta de NPS, um doador de NO independente da via endotelial, disponibilizando diretamente para as células musculares lisas o NO, favorecendo, portanto, o vasorelaxamento. Foi observado que as artérias pulmonares do grupo MCT apresentaram diminuição da porcentagem de relaxamento quando comparados ao grupo CTL.

Resultados semelhantes também foram demonstrados nos trabalhos de CHRISTOU et al. (2012); MAM et al. (2010); CHRISTOU et al. (2018) e KAZAMA et al. (2014). Quanto aos tratamentos utilizados no presente trabalho, foi visto que o CRV 50mg/Kg aumentou de forma significativa a porcentagem de relaxamento quando comparado ao grupo MCT, demonstrando que esta substância é promissora para a prevenção da disfunção das células musculares lisas.

Vale ressaltar que os trabalhos de CHRISTOU et al. (2012) e MAM et al. (2010) também realizaram reatividade em anéis de artéria mesentérica, onde demonstraram que as curvas concentração-resposta de ACh, NPS e FEN nos animais induzidos à HP não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos, CHRISTOU et al. (2018) além de utilizar secções de mesentérica também realizaram reatividade em secções de aorta. Os dados destas pesquisas demonstram que as alterações decorrentes pela HP são específicas para a circulação pulmonar, visto que não houve alterações na artéria mesentérica e aorta.

Além da análise de reatividade vascular, secções de artéria pulmonar foram armazenadas para avaliar o efeito do carvacrol no remodelamento vascular pulmonar, por meio da histologia, assim como para a análise da produção de ânions superóxidos nos tecidos das artérias pulmonares através da microscopia de fluorescência.

Os resultados da histologia mostraram que o grupo MCT apresentou parede vascular mais espessa quando comparados ao grupo controle, demonstrando que a monocrotalina causou alterações estruturais nas artérias pulmonares através da produção exacerbada de células musculares lisas, favorecendo o remodelamento vascular pulmonar. Estas

alterações estruturais causadas pela monocrotalina também foram visualizadas nos trabalhos de LOON et al. (2015); VARSHNEY et al. (2016) e PAN et al. (2015).

O tratamento com carvacrol 100mg/Kg reduziu significativamente a produção de células musculares lisas. ZHANG et al. (2015) também mostrou em sua pesquisa que o carvacrol atenua o remodelamento vascular pulmonar de ratos com HP através de hipóxia, demonstrando que este monoterpene exerce efeito apoptótico nas células musculares lisas. O tratamento com sildenafila também obteve efeito promissor, este resultado pode ser decorrente da redução das metaloproteinases de matriz (MMPs). Estas MMPs estão envolvidas no remodelamento vascular da artéria pulmonar através da proliferação e migração de células musculares lisas (ZELKO et al., 2016), e de acordo com a literatura científica, o sildenafila diminui a expressão destas MMPs (KUANG et al., 2010; SHERMULY et al., 2004).

Quanto às análises para avaliar o estresse oxidativo foi visto que os animais do grupo MCT apresentaram alta intensidade de fluorescência emitida pelo DHE nos cortes de artéria pulmonar quando comparados ao grupo CTL, demonstrando que a HP induzida por monocrotalina gera aumento acentuado na produção de ROS principalmente de $O_2^{\cdot-}$ já que o DHE é considerado a sonda fluorescente mais específica para a detecção deste tipo de espécie reativa (WOJTALA et al., 2014).

Os resultados com as diferentes dosagens do carvacrol (CRV 50mg/Kg e CRV 100mg/Kg) mostraram considerável redução do estresse oxidativo, quando comparados ao grupo MCT, evidenciando seu efeito antioxidante. De forma semelhante, o grupo tratado com sildenafila também apresentou diminuição da intensidade de fluorescência.

O trabalho de ZHANG et al. (2015), observou o efeito antioxidante do carvacrol por meio da análise da concentração de malondialdeído (MDA) através do ácido tiobarbitúrico, assim como das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutatona (GSH) nas células musculares lisas da artéria pulmonar de ratos induzido à HP por meio de hipóxia. Eles mostraram que o carvacrol reduziu as concentrações de MDA e aumentou as concentrações de SOD e GSH.

Outros trabalhos, mas não voltados para a HP, demonstraram a propriedade antioxidante do carvacrol em seus respectivos estudos, um deles foi realizado em nosso laboratório a qual mostrou que o carvacrol reduziu a intensidade de fluorescência em tiras de corpos cavernosos de ratos espontaneamente hipertensos (GONÇALVES, 2018). WANG et al. (2017), por sua vez, avaliou o efeito antioxidante do carvacrol em camundongos que foram induzidos a danos nos neurônios do hipocampo por meio do etanol.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são conceituadas como produtos celulares derivados do metabolismo do oxigênio (FREUND – MICHEL et al., 2013), que podem ser radicais livres, ou seja, possuem elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, como por exemplo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila ($\cdot HO$), hipoclorito ($ClO^{\cdot-}$) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), ou, mesmo contendo elétrons emparelhados

em sua última camada eletrônica são considerados agentes oxidantes pois ao interagirem com outros elétrons e moléculas, formam espécies reativas altamente tóxicas para as células como por exemplo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, ao interagir com metais de transição reduzidos são convertidos no $\cdot HO$, o qual, pode gerar alterações estruturais nos sistemas biológicos (DRÖGE, 2002; TRACHOOTHAM et al., 2008). Também há outros agentes oxidantes, como por exemplo o ozônio (O_3) e oxigênio *singlet* (1O_2) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; CAMPAGNARO., 2012).

É importante ressaltar que ROS são naturalmente produzidas em pequenas quantidades, o $O_2\cdot^-$, por exemplo é produzido na maioria das células aeróbicas durante a ativação de monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Ademais estão presentes na vasculatura pulmonar (FREUND – MICHEL et al., 2013). ROS atuam como moléculas sinalizadoras, promovendo a proliferação e sobrevivência celular, o que é importante para a regulação da função da célula (TRACHOOTHAM et al., 2008). Para limitar o excesso de ROS e consequentemente proteger o organismo, há a síntese de antioxidantes que podem ser enzimáticos, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), ou não enzimáticos como as vitaminas A (retinol), C (ácido ascórbico) e E (tocoferol) (TSUTSUI et al., 2011).

Todavia, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de pró-oxidantes e antioxidantes gera o conhecido estresse oxidativo, que causa efeitos deletérios nos lipídeos (gerando a lipoperoxidação), proteínas, ácidos nucleicos e matriz extracelular, e está associado a doenças neurodegenerativas, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (LIGUORI et al., 2018) como aterosclerose, isquemia e reperfusão cardíaca, hipertensão sistêmica (FREUND – MICHEL et al., 2013; TSUTSUI et al., 2011) e a HP, que neste caso, o aumento da quantidade de $O_2\cdot^-$ produzido principalmente pela NADPH oxidase, assim como a xantina oxidase (XO), eNOS desacoplada e cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, favorece a disfunção endotelial e remodelamento vascular pulmonar (FREUND – MICHEL et al., 2013; TABIMA et al., 2012; DE MARCO et al., 2010).

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, podemos observar que o carvacrol demonstrou efeitos consideráveis para redução da pressão sistólica ventricular direita, hipertrofia ventricular direita, estresse oxidativo e remodelamento vascular pulmonar, além de prevenir a disfunção endotelial. Estes efeitos podem ser decorrentes de sua ação sobre os canais TRPs, pois consta na literatura científica que há canais TRPs presentes no leito vascular pulmonar (XIA et al., 2013; GEPPETTI et al., 2006; CIOFFI et al., 2009; YUE et al., 2015; FRANCIS et al., 2016; WANG et al., 2016; LIN et al., 2004), e estes podem estar envolvidos no desenvolvimento da HP, como foi observado no trabalho de YU et al. (2004) onde foi observado que pacientes com hipertensão arterial pulmonar idiopática apresentam elevada expressão dos canais TRPC3 e TRPC6 quando comparados a pacientes saudáveis, o que também foi abordado nos trabalhos de KUNICHIKA et al. (2004) e INOUE et al. (2006). Além disso, há que os canais TRPV4 estão relacionados com a injúria pulmonar (ALVAREZ et al., 2006). Também há descrito na literatura científica que o carvacrol atua sobre os canais TRPs (PARNAS et al., 2009;

MACPHERSON et al., 2006; XU et al., 2006; PREMKUMAR, 2004; PARK et al., 2014; AYDIN et al., 2007; LOU et al., 2016; PETERS et al., 2012), fato também observado em nosso laboratório através do trabalho de DANTAS (2014) que avaliou o envolvimento dos canais TRPs na hipertensão e o efeito do carvacrol no sistema cardiovascular de ratos espontaneamente hipertensos.

Logo, nos gera a hipótese de que o carvacrol pode estar agindo sobre estes canais TRPs fazendo com que haja a diminuição da proliferação de células musculares lisas, o que contribui para a atenuação do remodelamento vascular pulmonar e hipertrofia ventricular direita. Ademais o carvacrol, por meio dos canais TRPs, pode corroborar para a atenuação do desequilíbrio entre os fatores vasoconstritores e vasorelaxantes, o que favorece na redução da disfunção endotelial, como foi observado na análise de reatividade vascular pulmonar através da curva concentração-resposta à ACh; e também melhorou a capacidade de resposta das artérias pulmonares ao agente vasoconstritor, FEN. Ao atenuar a disfunção endotelial, ocorre aumento na disponibilidade de NO, favorecendo o vasorelaxamento e consequentemente, a diminuição da pressão arterial pulmonar.

O efeito antioxidante que o carvacrol possui também pode estar relacionado a sua ação sobre os canais TRPs, pois estes canais são sensíveis ao estresse oxidativo (HECQUET et al., 2008). Ademais, o próprio efeito antioxidante contribui para a atenuação da disfunção endotelial, remodelamento vascular, pressão arterial pulmonar e hipertrofia ventricular direita, o que consequentemente, amplifica o efeito do carvacrol no tratamento para a HP.

Conclusão

7. Conclusão

Os dados observados no presente trabalho demonstraram que a monocrotalina promoveu, de forma semelhante, as principais alterações fisiológicas que estão presentes no quadro de hipertensão pulmonar que acomete os humanos. O tratamento com carvacrol em ratos com hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina apresentou efeitos importantes, pois demonstrou eficácia na atenuação da pressão arterial pulmonar, hipertrofia ventricular direita, disfunção endotelial, remodelamento vascular pulmonar e estresse oxidativo, efeitos estes que podem estar relacionados a sua ação sobre os canais TRPs, consequentemente, temos como perspectiva investigar os mecanismos moleculares do carvacrol frente aos canais TRPs, tendo em vista que estes canais estão presentes no leito vascular pulmonar e podem estar relacionados com o desenvolvimento da hipertensão pulmonar.

Referências Bibliográficas

8. Referências Bibliográficas

ABDELAZIZ T MOHAMMED.; RASHED A. L.; MAHFOUZ S.; GHARIB M. D.; EL-SAYED R.; GABER M. R. The potential efficacy of endothelial progenitor cells with and without nitric oxide inducer as cell therapy for right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension in rats. **Medical Journal of Cairo University**, v. 83, n. 2, p. 25 – 31, 2015.

AIRES M. M. Fisiologia. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2012.

ALENCAR N. K. A.; PEREIRA L. S.; MONTAGNOLI L. T.; MAIA C. R.; KUMMERLE E A.; LANDGRAF S. S.; NEVES C. C.; FERRAZ B. E.; TESCH R.; NASCIMENTO M. H. J.; DE SANT' ANNA R. M. A.; FRAGA M. A. C.; BARREIRO J. E.; SUDO T. R.; SUDO Z. G. Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A_{2A} receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 5, p. 953 – 962, 2013.

ALIOTTA J. M.; PEREIRA.; WEN S.; DOONER M. S.; DEL TATTO M.; PAPA E.; CHENG Y.; GOLDBERG L.; VENTETUOLO C. E.; LIANG O.; KLINGER J. R.; QUESENBERRY P. J. Bone marrow endothelial progenitor cells are the cellular mediators of pulmonary hypertension in the murine monocrotaline injury model. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 7, p. 1595 – 1606, 2017.

ALMEIDA R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. Monografia de Conclusão de Curso – Grau Acadêmico Bacharelado em Química, Universidade Federal de São João del –Rei, 2015.

ALTURA M. B. & ALTURA T. B. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p. 1698 – 1705, 1970.

ALVAREZ F. D.; KING A. J.; WEBER D.; ADDISON E.; LIEDTKE W.; TOWNSLEY I. M. TRPV4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: A novel mechanism of acute lung injury. **Circulation Research**, v. 99, n. 9, p. 988 – 995, 2006.

ARAÚJO M. Medicina interna. **Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna**, v. 17, p. 1 - 58, 2010.

ARIGESAVAN K.; SUDHANDIRAN G. Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1, 2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of fischer 344 rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 2, p. 314 – 320, 2015.

AYDIN Y.;KUTLAY Ö.; ARI S.; DUMAN S.;UZUNER K.; AYDIN S. Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. **Planta Medica**, v. 73, n. 13, p. 1365 – 1371, 2007.

- BARRETO R. A.; HUGHES J. B.; SOUZA C. S.; SILVA V. D. A.; SILVA A.R.; VELOZO E. S.; BATATINHA M. J. M.; COSTA M. F. D.; EL-BACHÁ R. S.; COSTA, S. L. O alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 5, n. 2, p. 112 – 127, 2006.
- BASTOS A. F. J.; MOREIRA A. J. I.; RIBEIRO P. T.; MEDEIROS A. I.; ANTONIOLLI R. A.; DE SOUSA P. D.; SANTOS V. R. M. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 4, p. 331 – 337, 2010.
- BERNE & LEVY. Fisiologia. 6ª Ed. Elsevier Editora. 2009.
- BILLAUD M.; DAHAN D.; MARTHAN R.; SAVINEAU J-P.; GUIBERT C. Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. **Respiratory Research**, v. 12, n. 30, p. 1 – 13, 2011.
- BOGHOSSIAN R. M.; PEIXOTO V. P.; BRITO F. M.; TOKARNIA H. C. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (Fabaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 149 – 156.
- BUENO-BETI C.; SASSI Y.; HAJJAR J. R.; HADRI L. Pulmonary artery hypertension model in rats by monocrotaline administration. **Experimental Models of Cardiovascular Diseases; Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 1816, p. 233 – 241, 2018.
- CARVALHO A. F. U.; MELO V. M. M.; CRAVEIRO A. A.; MACHADO M. I. L.; BANTIM M. B.; RABELO E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* cham. against *Aedes aegypti* linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569 – 571, 2003.
- CABANILLAS Q. G. J. **Reatividade vascular de aorta e artéria pulmonar provenientes de ratos portadores de encefalomielite alérgica experimental**. 2006 Dissertação de mestrado. Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas. Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- CALLOU A. R. M. & RAMOS M. R. P. 16. Hipertensão arterial pulmonar – Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia para Grávidas na Mulher Portadora de Cardiopatia. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93, n. 6 suplementar 1, p. e100 – e178, 2009.
- CAMPAGNARO P. B.; TONINI L. C.; NOGUEIRA V. B.; CASARINI E. D.; VASQUEZ C. E.; MEYRELLES S. S. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. **International Journal of Hypertension**, v. 2013, p. 1 – 11, 2013.

CARNESECCHI S.; BRAS-GONÇALVES R.; BRADAIA A.; ZEISEL M.; GOSSÉ F.; POUPON M-F.; RAUL F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Letters**, v. 215, n. 1, p. 53 – 59, 2004.

CARVALHO C. H. M.; NIGRO D.; LEMOS S. V.; TOSTES A. C. R.; FORTES B. Z. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76 – 88, 2001.

CHEN W-L.; BARSZCZYK A.; TURLOVA E.; , DEURLOO M.; LIU B.; YANG B. B.; RUTKA T. J.; FENG Z-P.; HONG H-S. Inhibition of TRPM7 by carvacrol suppresses glioblastoma cell proliferation, migration and invasion. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 16321 – 16340, 2015.

CHRISTOU H.; HUDALLA H.; MICHAEL Z.; FILATAVA J. E.; LI J.; ZHU M.; POSSOMATO-VIEIRA J. S.; DIAS-JUNIOR C.; KOUREMBANAS S.; KHALIL A. R. Impaired pulmonary arterial vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation underlie severe pulmonary hypertension in the sugen-hypoxia rat model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 364, p. 258 – 274, 2018.

CHRISTOU H.; RESLAN O. M.; MAM V.; TANBE F. A.; VITALI H. S.; TOUMA M.; ARON E.; MITSIALIS A. S.; KOUREMBANAS S.; KHALIL A. R. Improved pulmonary vascular reactivity and decreased hypertrophic remodeling during nonhypercapnic acidosis in experimental pulmonary hypertension, **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, p. L875 – L890, 2012.

CIOFFI L. D.; LOWE K.; ALVAREZ F. D.; BARRY C.; STEVENS T. TRPing on the lung endothelium: calcium channels that regulate barrier function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 765 – 776, 2009.

CSISZAR A.; LABINSKY N.; OLSON S.; PINTO T. J.; GUPTE S.; WU M. J.; HU F.; BALLABH P.; PODLUTSKY A.; LOSONCZY G.; CABO R.; MATHEW R.; W. S. M.; UNGVARI Z. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Hypertension**, v. 54, n. 3, p. 668 – 675, 2009.

DA SILVA R. R. S.; VELOSO G. S. L.; RIBEIRO. P. T. O estado da arte para hipertensão arterial pulmonar: ênfase em modelos experimentais. **Revista Campo do Saber**, v. 3, n. 1, p. 1 – 13, 2017.

D'ALONZO E. G.; BARST J. R.; AYRES M. S.; BERGOFSKY H. E.; BRUNDAGE H. B.; DETRE M. K.; FISHMAN P. A.; GOLDRING M R; GROVES B. M.; KERNIS. J.; LEVY S. P.; PIETRA G. G.; REID M. L.; REEVES J. T.; VREIM A.; WILLIAMS; MARGARET WU. Survival in patients with primary pulmonary hypertension: results

from a national prospective registry. **Annals of Internal Medicine**, v. 115, p. 343 – 349, 1991.

DANTAS, V. P. B. **O carvacrol reduz a pressão arterial via ativação de canais receptores de potencial transiente em ratos espontaneamente hipertensos**. 2014. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais. Universidade Federal da Paraíba, 2014.

DEMARCO G. V.; WHALEY-CONNELL T. A.; SOWERS R. J.; HABIBI J.; DELLSPERGER C. K. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. **World Journal of Cardiology**, v. 2, n. 10, p. 316 – 324, 2010.

DEVIHA S. V.; RENGARAJAN P.; HUSSAIN J. R. Modeling blood flow in the blood vessels of the cardiovascular system using fractals. **Applied Mathematical Sciences**, v. 7, n. 11, p. 527 – 537, 2013.

DE MENDONÇA L.; FELIX S. N.; BLANCO G. N.; DA SILVA. S. J.; FERREIRA P. T.; ABREU C. S.; CRUZ F. F.; ROCHA N.; SILVA M P.; MARTINS V.; CAPELOZZI L. C.; ZAPATA-SUDO G.; ROCCO M. R. P.; SILVA L. P. Mesenchymal stromal cell therapy reduces lung inflammation and vascular remodeling and improves hemodynamics in experimental pulmonary arterial hypertension. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 220, p.1 – 15, 2017.

DE SOUZA C. A.; HATAYDE R. M.; BECHARA H. G. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *crotalaria spectabilis* (fabaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 12 – 18, 1997.

DELBIN A. M. **Reatividade vascular de artérias mesentérica e Pulmonar de ratos após isquemia/reperfusão pulmonar: Efeito do treinamento físico**. 2009. Tese de doutorado. Ciência da Motricidade (Biodinâmica da Motricidade Humana). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2009.

DIAS T. A.; RODRIGUES P. B.; PORTO L. M.; GAVA L. A.; BALARINI M. C.; FREITAS S. P. F.; PALOMINO Z.; CASARINI E D.; CAMPAGNARO P. B.; PEREIRA M. C. T.; MEYRELLES S. S.; VASQUEZ C. E. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, p. 1 – 11, 2014.

DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47 – 95, 2002.

DUSSE S. M. L.; VIEIRA M. L.; CARVALHO G. M. Revisão sobre o óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343 – 350, 2003.

DWORAKOWSKI R.; ALOM-RUIZ P. S.; SHAH M A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. **Pharmacological Reports**, v. p. 21 – 28, 2008.

EARLY S. & BRAYDEN E. J. Transient receptor potential channels in the vasculature. **American Journal of Physiology**, v. 95, p. 645 – 690, 2015.

EARLY S. GONZALES L. A.; CRNICH R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca²⁺-activated K⁺ channels. **Circulation Research**, v. 104, n. 8, p. 987 – 994, 2009.

EARLY S.; GONZALES L. A.; GARCIA I. Z.; ZARINE I, G. A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation. **Molecular Pharmacology**, v. 77, n. 4, p. 612 – 620, 2010.

FACHINI-QUEIROZ C. F.; KUMMER R.; ESTEVÃO-SILVA F. C.; CARVALHO B. D. M.; CUNHA M. J.; GRESPAN R.; BERSANI-AMADO A. C.; CUMAN N. K. R. Effects of thymol and carvacrol, constituents of thymus vulgaris l. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1 – 11, 2012.

FALLAH F. Recent strategies in treatment of pulmonary arterial hypertension, a review. **Global Journal of Health Science**, v. 7, n. 4, p. 307 – 322, 2015.

FRANCIS M.; XU N.; ZHOU C.; STEVENS T. Transient receptor potential channel 4 encodes a vascular permeability defect and high-frequency Ca²⁺ transients in severe pulmonary arterial hypertension. **The American Journal of Pathology**, v. 186, n. 6, p. 1701 – 1709, 2016.

FRIEDBERG M. & REDINGTON A. Right versus left ventricular failure Differences, similarities, and interactions. **Circulation**, v. 129, n. 9, p. 1033 – 1044, 2014.

FERREIRA A. L.A. & MATSUBARA S. L.; Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61 – 38, 1997.

FREUD-MICHEL V.; GUIBERT C.; DUBOIS M.; COURTOIS A.; MARTHAN R.; SAVINEAU J-P.; MULLER B. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. **Therapeutic Advances in Respiratory Disease**, v. 7, n. 3, p. 175 – 200, 2013.

FROST E.; A.; BADESCH D.; BARST R.; BENZA L. R.; ELLIOTT G.; FARBER W. H.; KRICHMAN A.; LIOU G. T.; RASKOB E. G.; WASON P.; FELDKIRCHER K.; TURNER M.; McGOON D. M. The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the united states. **Chest**, v. 139, n. 1, p. 128 – 137, 2011.

GALIÈ N.; McLAUGHLIN V. V., RUBIN J. L.; SIMONNEAU G. An overview of the 6th world symposium on pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal**, v.53, n. 4, p. 1-4, 2018.

GALIÈ N.; HUBMERT M.; VACHIER J-C.; GIBBS S.; LANG I.; TORBICKI A.; SIMONNEAU G.; PEACOCK A.; NOORDEGRAAF V. A.; BEGHETTI M.; GHOFrani A.; SANCHEZ G. A. M.; HANSMANN G.; KLEPETKO W. ; LANCELLOTTI P.; MATUCCI M.; McDONAGH T.; PIERARD A. L.; TRINDADE T. P.; ZOMPATORI M.; HOEPER M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. **European Heart Journal**, n. 37, p. 67 – 119, 2016.

GARCIA R.; ALVES S. S. E.; SANTOS P. M.; AQUIJE V. F. M. G.; FERNANDES R. A.; DOS SANTOS B. R.; VENTURA A. J.; FERNANDES B. M. P. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 163 – 168, 2008.

GEPPETTI P.; MATERAZZI S.; NICOLETTI P. The transient receptor potential vanilloid 1: Role in airway inflammation and disease. **European Journal Pharmacology**, v. 533, p. 207 – 214, 2006.

GONÇALVES F. A. T. **Caracterização dos Benefícios do Carvacrol Sobre a Disfunção Erétil de Ratos Hipertensos**. 2018. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais. Universidade Federal da Paraíba, 2018.

GRABMANN J. Terpenoids as plants antioxidants. **Vitamins & Hormones**, v. 72, p. 505 – 535, 2005.

GREYSON R. C. The right ventricle and pulmonary circulation: basic concepts. **Revista Española de Cardiología**, v. 63, n. 1, p. 81 – 95, 2010.

GROBE C. A.; WELLS M. S.; BENAVIDEZ E.; OISHI P.; AZAKIE A.; FINEMAN R. JEFFREY.; BLACK M. S. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n.6, p. L1069 – L 1077, 2006.

GUIMARÃES A. G.; XAVIER M. A.; SANTANA M. T.; CAMARGO E. A.; SANTOS C. A.; BRITO F. A.; BARRETO E. O.; CAVALCANTI S. C. H.; ANTONIOLLI A. R.; OLIVEIRA R. C. M.; QUINTANS-JÚNIOR L. J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 385, n.3, p. 253 – 263, 2012.

GUYTON & HALL. Tratado de Fisiologia Médica. 12ª Ed. Elsevier Editora. 2011.

HAMBLY N.; ALAWFI F.; MEHTA S. Pulmonary hypertension: diagnostic approach and optimal management. **Canadian Medical Association Journal**, v, 188, n. 11, p. 804 – 812, 2016.

HARRIS N. P.; ANDERSON C. R.; CHEN K. K. The action of monocrotaline and retronecine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 75, n. 1, p. 78 – 82, 1942.

HECQUET M. C.; AHMMED U. G.; VOGEL M. S.; MALIK B. A. Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. **Circulation Research**, v. 102, n. 3, p. 347 – 355, 2008.

HENRIQUES-COELHO T.; BRANDÃO-NOGUEIRA A.; MOREIRA-GONÇALVES D.; CORREIA-PINTO J.; LEITE-MOREIRA A. F. Efeitos do antagonismo do tnf- α na hipertensão pulmonar induzida pela monocrotalina. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 27, n. 3, p. 341 – 348, 2008.

HOEPER M. M.; GHOFrani HOSSEIN-ARDESCHIR.; GRUNIG E.; KLOSE H. OLSCHIEWSKI H.; ROSENKRANZ S. Pulmonary hypertension. **Deutscher Arzteblatt International**, v. 114, n. 5, p. 73 – 84, 2017.

HORVATHOVA E.; TURCANIOVA V.; SLAMENOVA D. Comparative study of DNA-damaging and DNA-protective effects of selected components of essential plant oils in human leukemic cells K562. **Neoplasma**, v. 54, n. 6, p. 478 – 483, 2007.

HUR J. D. & SUGENG L. Non-invasive multimodality cardiovascular imaging of the right heart and pulmonary circulation in pulmonary hypertension. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. 24, p. 1 – 26, 2019.

HUXTABLE J. R. Activation and pulmonar toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 371 – 389, 1990.

INOUE R.; J. J. L.; SHI J.; MORITA H.; NISHIDA M.; HONDA A.; ITO Y. Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. **Circulation Research**, v. 99, p. 119 – 131, 2006.

JARDIM C, & WAETGE D. A importância do simpósio mundial de hipertensão pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 3, p. 173 – 174, 2018.

JÚNIOR H. R. E. J.; SOARES M. P.; DE MELO L. C.; FILHO A. V. C. A.; FILHO S. G. J.; FILHO B. M. J.; SOUSA F. C. F.; FONTELES F. M. M.; LEAL DE A. K. L.; DE QUEIROZ R. G. M.; VASCONCÊLOS M. M. S. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 453 – 458, 2010.

JÚNIOR M. L. Hipertensão pulmonar. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 16, n. 4, p. 161 – 163, 2014.

JÚNIOR W. E. **Efeitos do Tratamento com Captopril e Losartan em Ratos Wistar e Espontaneamente Hipertensos Submetidos a Hipertensão Arterial Pulmonar com Monocrotalina**. 2011. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.

KAMEZAKI F.; TASAKI H.; YAMASHITA K.; TSUTSUI M.; KOIDE S.; NAKATA S.; TANIMOTO A.; OKAZAKI M.; SASAGURI Y.; ADACHI T.; OTSUJI Y. Gene Transfer of Extracellular Superoxide Dismutase Ameliorates Pulmonary Hypertension in Rats. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 177, n. 2, p. 219 – 226, 2008.

KASS J. D.; RATTIGAN E.; KAHLOON R.; LOH K.; YU L.; SAVIR A.; MARKOWSKI M.; SAQI A.; RAJKUMAR R.; AHMAD F.; CHAMPION C. H. Early treatment with fumagillin, an inhibitor of methionine aminopeptidase-2, prevents pulmonary hypertension in monocrotaline-injured rats. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 1 – 15, 2012.

KAZAMA K.; OKADA M.; YAMAWAKI H. A novel adipocytokine, omentin, inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 452, n. 1, p. 142 – 146, 2014.

KIM K-H.; KIM H-K.; CHAN Y. S.; KIM Y-J.; SOHN D-W. Hemodynamic and histopathologic benefits of early treatment with macitentan in a rat model of pulmonary arterial hypertension. **Korean Circulation Journal**, v. 48, n. 9, p. 839 – 853, 2018.

KÖGLER H.; HARTMANN O.; LEINEWEBER K.; van NGUYEN P.; SCHOTT O – E B.; HASENFUSS G. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. **Circulation Research**, v. 93, p. 230 – 237, 2003.

KOLLETIS T.; VLAHOS P. A.; LOUKA M.; HATZISTERGOS E. K.; BALTOGIANNIS G. G.; AGELAKI . M.; MITSIS A.; MALAMOU-MITSIS V. Characterisation of a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension. **Hellenic Journal of Cardiology**, n. 48, p. 206 – 210, 2007.

KUANG T.; WANG J.; PANG B.; HUANG X.; BURG D. E.; YUAN J. X. J.; WANG C. Combination of sildenafil and simvastatin ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 5, p. 456 – 464, 2010.

KUMAMOTO E.; FUJITA T. Review: Differential activation of trp channels in the adult rat spinal substantia gelatinosa by stereoisomers of plant-derived chemicals. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 3, p. 1 – 18, 2016.

KUMMER W. Pulmonary vascular innervation and its role in responses to hypoxia. **Proceedings of The American Thoracic Society**, v.8, n. 6, p. 471 – 476, 2011.

KUNICHIKA N.; LANDSBERG W. J.; YU Y.; KUNICHIKA H.; THISTLETHWAITE A. P.; RUBIN J. L.; YUAN X.-J. X. Bosentan inhibits transient receptor potential channel expression in pulmonary vascular myocytes. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, p.1101 – 1107, 2004.

LAI C-Y.; POTOKA C. K.; CHAMPION C. H.; MORA L. A.; GLADWIN T. M. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. **Circulation Research**, v. 115, n.1, 115 – 130, 2014.

LAJOIE A-C.; BONNET S.; PROVENCHER S. Combination therapy in pulmonary arterial hypertension: recent accomplishments and future challenges. **Pulmonary Circulation**, v. 7, n. 2, p. 312 – 325, 2017.

LAPA S. M.; FERREIRA M. V. E.; JARDIM C.; MARTINS S. C. B.; ARAKAKI O. S. J.; SOUZA R. Características clínicas dos pacientes com hipertensão pulmonar em Dois centros de referência em São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 3, p. 139 – 143, 2006.

LEAL M. C. **Avaliação Farmacológica do Derivado N-acilidrazônico LASSBio-1027 em Modelos de Hipertensão Arterial Sistêmica e Hipertensão Arterial Pulmonar**. 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

LEE H.; KIM C. K.; HONG M. Y. Change of voltage-gated potassium channel 1.7 expressions in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model. **Korean Journal of Pediatrics**, v. 61, n. 9, p. 271 – 278, 2018.

LIGUORI I.; RUSSO G.; CURCIO F.; BULLI G.; ARAN L.; DELLA-MORTE D.; GARGIULO G.; TESTA G.; CACCIATORE F.; BONADUCE D.; ABETE P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Dovepress**, v. 13, p. 757 – 772, 2018.

LIN M-J.; LEUNG H. P. G.; ZHANG W-M.; YANG X-R.; YIP K-P.; TSE C-M.; SHAM K. S. J. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. **Circulation Research**, v. 95, n. 5, p. 496 – 505, 2004.

LO W. C.C.; MOOSAVI M. S.; BUBB K. The regulation of pulmonary vascular tone by neuropeptides and the implications for pulmonary hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 1167, p. 1 – 19, 2018.

LOON E. L. R.; BARTELDSEB.; WAGENER G. T. D. A. F.; AFFARA N.; MOHAUPT S.; WIJNBERG H.; PENNING S.; TAKENS J.; BERGER F. M. R.

Erythropoietin attenuates pulmonary vascular remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension through interplay between endothelial progenitor cells and heme oxygenase. **Frontiers in Pediatrics**, v. 3, n. 71, p. 1 – 10, 2015.

LUCENA B. R.; RISSI R. D.; MAIA A. L.; FLORES M. M.; DANTAS M.; F. A.; NOBRE T. D. C.; RIET-CORREA F.; BARROS L. S. C. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 447 – 452, 2010.

LUDKE A.; MOSELE F.; CARON-LIENERT R.; RIBEIRO M.; PARTATA W.; LLESUY S.; ARAUJO A.; SINGAL P.; BELLÓ-KLEIN A. Modulation of monocrotaline-induced *cor pulmonale* by grape juice. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 89 – 95, 2010.

LUO Y.; WU J-Y.; LU M-H.; SHI Z.; NING N.; DI J-M. Carvacrol alleviates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion through regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1 – 11, 2016.

MA W.; HAN W.; GREER A. P.; TUDER M. R.; TOQUE A. H.; WANG W. K. K.; CALDWELL W. R.; SU Y. Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 11, p. 4548 – 4566, 2011.

MACHADO C.; BRITO Í.; SOUZA D.; CORREIA C. L. Frequência etiológica da hipertensão pulmonar em ambulatório de referência na bahia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n. 6, p. 679 – 986, 2009.

MACIEL P. M. P. **Efeito da Fração Aquosa de *Cissampelos sympodialis* Eichl. Em Artéria Pulmonar de Rato com Hipertensão Pulmonar Induzida por Monocrotalina**. 2015. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais. Universidade Federal da Paraíba, 2015.

MACPHERSON J. L.; HWANG W. S.; MIYAMOTO T.; DUBIN E. A.; PATAPOUTIAN A.; STORY M. G. More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 32, n. 4, p. 335 – 343, 2006.

MAIR K. M.; JOHANCEN A. K. K.; WRIGHT A. F.; WALLACE E.; MacLEAN. Pulmonary arterial hypertension: basis of sex differences in incidence and treatment response. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 567 – 579, 2014.

MAM V.; TANBE F. A.; VITALI H. S.; ARONS E.; CHRISTOU A. H.; KHALIL A. R. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries

of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 455 – 462, 2010.

McGOON D. M. & KANE C. GARVAN. Pulmonary hypertension: diagnosis and management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 84, n. 2, p. 191 – 207, 2009.

MENEZES C. A. I.; BARRETO N. M. C.; ANTONIOLLI R. A.; SANTOS V. R. M.; DE SOUSA P. D. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. **Journal Bioscience**, v. 65, n. 9, p. 562 – 566, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico Diretrizes Terapêuticas da Hipertensão Arterial Pulmonar. Portaria nº 35, 16/01/2014.

MIURA M.; Hirose M.; Endoh H.; Wakayama Y.; SUGAI Y.; NAKANO M.; FUKUDA K.; SHINDOH C.; SHIRATO K.; SHIMOKAWA H. Acceleration of CA^{2+} waves in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. **Circulation Journal**, v. 75, p. 1343 – 1349, 2011.

MIRSKY R.; JAHN S.; KOSKENVUO W. J.; SIEVERS E. R.; YIM M. S.; RITNER C.; BERNSTEIN S. H.; ANGELI S. F.; BOYLE J. A.; DE MARCO T.; YEGHIAZARIANS Y. Treatment of pulmonary arterial hypertension with circulating angiogenic cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 301, p. 12 – 19, 2011.

MONTANI D.; CHAUMAIS C. M.; GUIGNABERT C.; GUNTHER S.; GIRERD B.; JAIS X.; ALGALARRONDO V.; PRICE C. L.; SAVALE L.; SITBON O.; SIMONNEAU G.; HUMBERT M. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, p. 172 – 191, 2014.

MONTANI D.; GUNTHER S.; DORFMULLER P.; PERROS F.; GIRERD B.; GARCIA G.; JAIS X.; SAVALE L.; ARTAUD-MACARI E.; PRICE C. L.; HUMBERT M.; SIMMONEAU G.; SITBON O. Pulmonary arterial hypertension. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, n. 97, p. 1 – 28, 2013.

MORRELL W. N.; ARCHER L. S.; DEFELICE A.; EVANS S.; FISZMAN M.; MARTIN T.; SOULNIER M.; RABINOVITCH M.; SCHERMULY R.; STEWART D.; TRUEBEL H.; WALKER G.; STENMARK R. K. Anticipated classes of new medications and molecular targets for pulmonary arterial hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 3, n. 1, 228 – 244, 2013.

NISHIKAWA T.; SAKU K.; KISHI T.; TOYHAMA T.; ABE K.; OGA Y.; ARIMURA T.; SAKAMOTO T.; YOSHIDA K.; SUNAGAWA K.; TSUTSUI H. Pulmonary arterial input impedance reflects the mechanical properties of pulmonary arterial remodeling in rats with pulmonary hypertension. **Life Sciences**, v. 1, n. 212, p. 225 – 232, 2018.

NOORDEGRAAGF V. A.; HADDAD F.; CHIN M. K.; FORFIA R. P.; KAWUT M. S.; LUMENS J.; NAEIJE R.; NEWMAN J.; OUDIZ J. R.; PROVENCHER S.; TORBICKI A.; VOELKEL F. N.; HASSOUN M. P. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension - physiology and pathobiology. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 25, p. D22- D33, 2013.

NOORDEGRAAGF V. A.; WESTERHOF E. B.; WESTERHOF N. The relationship between the right ventricle and its load in pulmonary hypertension. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 69, n. 2, p. 236 – 243, 2017.

OKADA M.; Harada T.; Kikuzuki R.; Yamawaki H.; Hara Y. Effects of telmisartan on right ventricular remodeling induced by monocrotaline in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 111, p. 193 – 200, 2009.

OZER K. E.; GOKTAS M. T.; TOKER A.; BARISKANER H.; UGURLUOGLU C.; ISKIT B. A. Effects of carvedilol on survival, mesenteric blood flow, aortic function and multiple organ injury in a murine model of polymicrobial sepsis. **Inflammation**, v. 40, n. 5, p. 1654 – 1663, 2017.

PADUCH R.; KANDEFER-SZERSZÉN M.; TRYTEK M.; FIEDUREKJ. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315 – 327, 2007.

PAFFETT L. M.; LUCAS N. S.; CAMPEN J. M. Resveratrol reverses monocrotaline-induced pulmonary vascular and cardiac dysfunction: a potential role for atrogen-1 in smooth muscle. **Vascular Pharmacology**, v. 56, n. 1 – 2, p. 64 – 73, 2012.

PAN Y.; WANG S.; YANG J.; CHEN B.; SUN Z.; YE L.; ZHU J.; WANG X. Interruption of cd40 pathway improves efficacy of transplanted endothelial progenitor cells in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.36, n.2, p. 683 – 696, 2015.

PARK S. H.; HONG C, KIM J. B.; SO I. The pathophysiologic roles of TRPM7 channel. **Korean Journal Physiology and Pharmacology**, v. 18, p.15 – 23, 2014.

PARNAS M.; PETERS M.; DADON D.; LEV S.; VERTKIN I.; SLUTSKY I.; MINKE B. Carvedilol is a novel inhibitor of Drosophila TRPL and mammalian TRPM7 channels. **Cell Calcium**, v. 45, n. 3, p.300 – 309, 2009.

PEACOCK, 2011 – Pulmonary Circulation, Diseases and Their Treatment, third edition - Disponível em:

<<https://books.google.com.br/books?id=1KnrVFPxD1gC&pg=PA243&lpg=PA243&dq=Pulmonary+hypertension,+%22plexogenic+pulmonary+arteriopathy%22+and+the+apetite+depressant+drug+aminorex:+post+or+propter?&source=bl&ots=Oz2xfJzxco&sig=ACfU3U0FKYTfSX9K7qdjJ3mN-5Udoh4MTA&hl=pt->

BR&sa=X&ved=2ahUKEwjdwuesms3hAhWyuVkKHcCqBZwQ6AEwA3oEACQAQ#v=onepage&q=Pulmonary%20hypertension%2C%20%22plexogenic%20pulmonary%20arteriopathy%22%20and%20the%20appetite%20depressant%20drug%20aminorex%3A%20post%20or%20propter%3F&f=false > Acesso em: 13/04/2019.

PEIXOTO-NEVES D.; SILVA - ALVES. S. K.; GOMES M. D. M.; LIMA C. F.; LAHLOU S.; MAGALHÃES P. J. C.; CECCATTO V. M.; COELHO – DE – SOUZA A. N.; LEAL- CARDOSO. J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.24, n. 3, p. 341 – 350, 2009.

PETERS M.; TREMBOVLER V.; ALEXANDROVICH A.; PARNAS M.; BIRNBAUMER L.; MINKE B.; SHOHAMI E. Carvacrol together with TRPC1 elimination improve functional recovery after traumatic brain injury in mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, p. 2831 – 2834, 2012.

PITANGA S. P. B. NASCIMENTO P. R.; DIÓGENES V.; COSTA L. S. The role of astrocytes in metabolism and neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, the main toxin of *Crotalaria retusa*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, n. 144, p. 1 – 7, 2012.

POLONIO B. I.; ACENCIO P. M. M.; PAZETTI R.; DE ALMEIDA M F.; DA SILVA S. B.; PEREIRA B. A. K.; SOUZA R. Tratamento com lodenafila no modelo de hipertensão pulmonar induzida por monocrotalina em ratos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 4, p. 421 – 424, 2014.

PREMKUMAR S. L. Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1117 – 1130, 2014.

RABE F. K.; TENOR H.; DENT G.; SCHUDT C.; NAKASHIMA M.; MAGNUSSEN H. Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. **The American Journal of Physiology**, v. 266, p. L 536 – L 543, 1994.

RANCHOUX B.; MELOCHE J.; PAULIN R.; BOUCHERAT O.; PROVENCHER S.; BONNET S. Review DNA Damage and Pulmonary Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p. 2 – 25, 2016.

RANG H. P. Farmacologia. 7ª Ed. Rio de Janeiro. Elsevier Editora. 2012.

RAPOPORT M. R. & MURAD F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circulation Research**, v. 52, n. 3, p. 352 – 357, 1983.

RICH D. J & RICH S. Clinical diagnosis of pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 130, p. 1820 – 1830, 2014.

RODAT-DESPOIX L.; CREVELH.; MARTHAN R.; SAVINEAU J.-P.; GUIBERT C. Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed. **Journal of Vascular Research**, v. 2008, n. 45, p. 181 – 192, 2008.

ROMANO E. S. Revisão conceitual de hipertensão pulmonar. **Pulmão RJ**, v. 19, n. 1-2, p. 33-39, 2010.

RUDOLPH V. & FREEMAN A. B. Cardiovascular consequences when nitric oxide and lipid signaling converge: convergence of NO and lipid signaling. **Circulation Research**, v. 105, n. 6, p. 1 – 25, 2009.

SAUVAGEAU S.; THORIN E.; VILLENEUVE L.; DUPUIS J. Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary hypertension: Role of ETB-receptor expression levels. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, n. 4, p. 311 – 317, 2009.

SAMARGHANDIAN S.; FARKHONDEH T.; SAMINI F.; BORJI A. Protective effects of carvacrol against oxidative stress induced by chronic stress in rat's brain, liver, and kidney. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 1 – 7, 2015.

SCHERMULY T R.; KREISSELMEIER P. K.; GHOFrani A. H.; YILMAZ HUSEYIN.; BUTROUS G.; ERMET L.; ERMET M.; WEISSMANN N.; ROSE F.; GUENTHER A.; WALMRATH D.; SEEGER W.; GRIMMINGER F. Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 1, p. 39 – 45, 2004.

SEN S. H.; SEN V.; BOZKURT M.; TURKÇU G.; GUZEL A.; SEZGI C.; ABAKAY O.; KAPLAN I. Carvacrol and pomegranate extract in treating methotrexate-induced lung oxidative injury in rats. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 1983 – 1990, 2014.

6TH WORLD SYMPOSIUM ON PULMONARY HYPERTENSION – Disponível em: < <https://wsph2018.com/>> Acesso em: 12/04/2019

SIGMA – ALDRICH - Ficha de informações de segurança de produtos químicos – Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=W224502&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2Fw224502%3Flang%3Dpt>> Acesso em: 27/06/2017.

SILVERTHORN U. D. Fisiologia Humana – Uma Abordagem Integrada. 5ª Ed. Porto Alegre, Artmed. 2010.

SILVERTHORN U. D. Fisiologia Humana – Uma Abordagem Integrada. 7ª Ed. Porto Alegre, Artmed. 2017.

SIMONNEAU G.; HUMBERT M. Target therapies in pulmonary arterial hypertension. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, n. 2, p. 172 – 191, 2014.

SIMONNEAU G.; GALIÈ N.; RUBIN L.; LANGLEBEN D.; SEEGER W.; DOMENIGHETTI G.; GIBBS S.; LEBREC D.; SPEICH R.; BEGHETTI M.; RICH S.; FISCHMAN A. Clinical classification of pulmonary hypertension. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 43, n. 12, p. S5 – S12, 2004.

SHIMODA A. L.; LAURIE S.S. Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension. **Journal Molecular Medicine** - Manuscript, v. 91, n. 3, p. 297 – 309, 2013.

SOMMER N.; DIETRICH A.; SCHERMULY R. T.; GHOFrani H. A.; GUDERMANN T.; SCHULZ R.; SEEGER W.; GRIMMINGER F.; WEISSMANN N. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. **European Respiratory Journal**, v. 32, p. 1639 – 1651, 2008.

SUEN C.; MEI J. H. S.; STEWART J. D. Therapy for pulmonary arterial hypertension: potential efficacy of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells. **Advances in Pulmonary Hypertension**, v. 11, n. 4, p. 33 – 38, 2012.

SUNTRES Z. E.; COCCIMIGLIO J.; ALIPOUR M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 304 - 318, 2014.

SUTENDRA G. & MICHELAKIS D. E. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. **Cell Metabolism**, v.19, n. 4, p. 558 – 573, 2014.

TABIMA M. D.; FRIZZELL S.; GLADWIN T. M. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p.1 – 41, 2012.

TAKIZAWA S.; NAGATA E.; NAKAYAMA T., MASUDA H.; ASAHARA T. Recent progress in endothelial progenitor cell culture systems: potential for stroke therapy. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 56, n. 6, p. 302 – 309, 2016.

THALER S. M. Eletrocardiograma. 2ª Ed. Porto Alegre, Artes Médicas.1997.

TOFOVIC P. S. Estrogens and development of pulmonary hypertension - Interaction of estradiol metabolism and pulmonary vascular Disease. **Journal Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 696 – 708, 2010.

TOSHNER M.; VOSWINCKEL R.; SOUTHWOOD M.; AL-LAMKI R.; HOWARD G. S. L.; MARCHESAN D.; YANG J.; SUNTHARALINGAM J.; SOON E.; EXLEY A.; STEWART S.; HECKER M.; ZHU Z.; GEHLING U.; SEEGER W.; PEPKE-ZABA J.; MORRELL W. N. Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 180, n. 8, p. 780 – 787, 2009.

TRACHOOTHAM D.; LU W.; OGASAWARA A. M.; VALLE R-D. N.; HUANG P.

Redox regulation of cell survival, **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 8, p. 1343 – 1373, 2008.

TSUTSUI H.; KINUGAWA S.; MATSUSHIMA S. Oxidative stress and heart failure. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, p. H2181 – H2190, 2011.

VALENTI E. V.; SATO A. M.; FERREIRA C.; DE ABREU C. L. Regulação neural do sistema cardiovascular: centros bulbares. **Revista Neurociências**, v. 15, n. 4, p. 317 – 320, 2007.

VARSHNEY R.; ALI Q.; WU C.; SUN Z. Monocrotaline-induced pulmonary hypertension involves downregulation of antiaging protein klotho and eNos activity. **Hypertension – Journal of The American Heart Association**, v. 68, n. 5, p. 1255 – 1263, 2016.

VIEIRA C. G. **Efeito do Tratamento por Nebulização com o Extrato Hidroalcoólico das Folhas de Cissampelos sympodialis Eichl. (Menispermaceae) em Camundongos Balb/c Sensibilizados com Ovalbumina**. 2008. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

VISWANATHAN G.; MAMAZHAKYPOV A.; SCHERMULY T. R.; RAJAGOPAL S. The role of G protein-coupled receptors in the right ventricle in pulmonary hypertension. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. 179, p. 1 – 24, 2018.

WHITE K.; DEMPSIE Y.; NILSEN M.; WRIGHT F. A.; LOUGHLIN L.; MacLEAN R. M. The serotonin transporter, gender, and 17 β oestradiol in the development of pulmonar arterial hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 90, p. 373 – 382, 2011.

WANG P.; LUO Q.; QIAO H.; DING H.; CAO Y.; YU J.; LIU R.; ZHANG Q.; ZHU H.; QU L. The neuroprotective effects of carvacrol on ethanol-induced hippocampal neurons impairment via the antioxidative and antiapoptotic pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1 – 17, 2017.

WANG Q.; WANG D.; YAN G.; SUN L.; TANG C. TRPC6 is required for hypoxia-induced basal intracellular calcium concentration elevation, and for the proliferation and migration of rat distal pulmonary venous smooth muscle cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 1577 – 1585, 2016.

WOJTALA A.; BONORA M.; MALINSKA D.; PINTON P.; DUSZYNSKI J.; WIECKOWSKI R. M. Chapter thirteen – methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods in Enzymology**, v. 542, p. 243 – 262, 2014.

XIA Y.; FU Z.; HU J.; HUANG C.; PAUDEL O.; CAI S.; LIEDTKE W.; SHAM K. S. J. TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 305, n. 7, p. C704 – C715, 2013.

XIAO R.; SU Y.; FENG T.; SUN M.; LIU B.; ZHANG J.; LU Y.; LI J.; WANG T.; ZHU L.; HU Q. Monocrotaline induces endothelial injury and pulmonary hypertension by targeting the extracellular calcium-sensing receptor. **Journal of The American Heart Association**, v. 6, n. 4, p. 1 – 16, 2017.

YANG JIN-XIU.; PAN YAN-YUN.; ZHAO YOU-YANG.; WANG XING-XIANG. Endothelial progenitor cell-based therapy for pulmonary arterial hypertension. **Cell Transplantation**, v. 22, p. 1325 – 1336, 2013.

YU Y.; FANTOZZI I.; REMILLARD V. C.; LANDSBERG W. J.; KUNICHIKA N.; PLATOSHYN O. TIGNO D. D.; THISTLETHWAITE A. P.; RUBIN J. L.; YUAN X. J. J. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 38, p. 13861 – 13866, 2004.

YUE Z.; XIE J.; YU S. A.; STOCK J.; DU J.; YUE L. Role of TRP channels in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, p. H157 – H182, 2015.

ZAPATA-SUDO G.; PONTES B. L.; SILVA S. J.; LIMA M. L.; NUNES C. K. I.; BARREIRO J. E.; SUDO TAKASHI R. Benzenesulfonamide attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in a rat model. **European Journal of Pharmacology**, v. 690, p. 176 – 182, 2012.

ZEINEH S. N.; BACHMAN N. T.; EL-HADDAD H.; CHAMPION H. C. Effects of acute intravenous iloprost on right ventricular hemodynamics in rats with chronic pulmonary hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 4, n. 4, p. 612 – 618, 2014.

ZELKO N. I.; ZHU J.; RITZENTHALER D. J.; ROMAN J. Pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice exposed to crystalline silica. **Respiratory Research**, v. 17, n. 160, p. 2 – 14, 2016.

ZHAO D. Y.; COURTMAN W. D.; DENG Y.; KUGATHASAN L.; ZHANG Q.; STEWART J. D. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. **Circulation Research**, v. 96, n. 4, p. 442 – 450, 2005.

ZHAO Y.; VANHOUTTE M. P.; LEUNG S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.129, p.83 – 94, 2015.

ZHANG Q.; FAN K.; WANG P.; YU J.; LIU R.; QI H.; SUN H.; CAO Y. Carvacrol induces the apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxia.

European Journal of Pharmacology, v. 770, p. 134 – 146, 2015.

ZHOU P.; TAN Y.; WANG H.; WANG G. Hypoxic preconditioning-induced autophagy enhances survival of engrafted endothelial progenitor cells in ischemic limb.

Journal of Cellular and Molecular Medicine, v. 20, n.10, p. 1 – 13, 2017.