

## MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL PULMONAR EM CAMUNDONGOS: DADOS PRELIMINARES

LARISSA RODRIGUES OLIVEIRA <sup>1</sup>; WELLINGTON DE ALMEIDA <sup>2</sup>; KAREN MARTIRENA MONKS DA SILVA<sup>3</sup>; TAÍS KOPP DA SILVEIRA<sup>4</sup>; PAOLA QUEVEDO DA COSTA<sup>5</sup>; PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL<sup>6</sup>;

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – larissaardgss@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – almeida.w@outlook.br*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – martirenakaren@gmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – taiskopp@gmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – quevedopaola97@gmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas – schenkel.paulo@gmail.com*

### 1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial pulmonar (HAP) é uma síndrome clínica grave, progressiva e com alta mortalidade. O desenvolvimento da HAP envolve uma série de mecanismos fisiopatológicos. Dentre eles, destaca-se a disfunção endotelial com exacerbação da produção de tromboxano A2 e de endotelina-1 associada a redução da atividade da prostaciclina e do óxido nítrico, gerando alteração do tônus dos vasos pulmonares que leva à vasoconstrição. Além disso, as alterações endoteliais geram diminuição das capacidades anticoagulantes e antitrombóticas dos vasos tornando os portadores dessa doença mais suscetíveis a eventos tromboembólicos pulmonares. Outro mecanismo importante é o remodelamento vascular pulmonar que envolve liberação de fatores de crescimento e alteração da matriz extracelular dos vasos que culminam em aumento da resistência vascular na pequena circulação e elevação dos níveis pressóricos no sistema arterial pulmonar (BARRETO et al., 2005).

Nas últimas décadas, tem havido um crescente interesse pela compreensão dos mecanismos fisiopatológicos atuantes na hipertensão pulmonar. Diante disso, modelos experimentais de indução da HAP em animais foram criados com o intuito de analisar esses mecanismos e propor estratégias de intervenção frente a doença. Tradicionalmente, utiliza-se a monocrotalina (MCT) em ratos Wistar por ser um modelo bem estabelecido para fins de pesquisa. A dosagem de 60 mg/kg por via intraperitoneal é a mais usada por induzir rápidas alterações nos capilares pulmonares que levam ao aumento da resistência vascular e da pós-carga no ventrículo direito (VD). Todos esses eventos culminam em remodelamento patológico do VD levando a hipertrofia e fibrose intersticial (GALIE et al., 2004). Nosso grupo de pesquisa (LaFiCardio- UFPel) possui experiência em modelos experimentais de indução da HAP em ratos (BRANCO, 2023; REIS, 2019), mas sua indução em camundongos ainda é um desafio. A literatura mostra que o metabolismo mais acelerado dos camundongos exige a administração de MCT por via subcutânea na dosagem de 600 mg/kg, uma vez por semana, durante oito semanas consecutivas. Contudo, a MCT é um reagente muito caro e testar alternativas de indução da HAP se torna vantajoso para realizarmos os testes com os compostos bioativos que temos analisado em camundongos há alguns anos (COSTA, 2023; SILVA, 2022; SILVEIRA, 2022; DEGRANDIS, 2021). Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a utilização de um protocolo alternativo ao método tradicional para indução da HAP com MCT, investigando a hipertrofia dos cardiomiócitos e o remodelamento das arteríolas pulmonares e cardíacas.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1- Local de pesquisa e animais

A pesquisa foi desenvolvida após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o número (CEEA nº 038180/2022-74) e ocorreu nas dependências do LaFiCardio e no Biotério Central, localizados no Campus Capão do Leão da UFPel, sendo utilizados 17 camundongos. As análises histológicas foram realizadas em parceria com o Departamento de Morfologia, no laboratório de histologia, localizado na Faculdade de Medicina da UFPel.

### 2.3- Indução da hipertensão arterial pulmonar com Monocrotalina

Para a indução da HAP, os animais foram divididos em cinco grupos sendo um deles o grupo controle (CT) e quatro deles grupos intervenção separados de acordo com a dose de MCT recebida. Os animais receberam injeção salina 0,9% (pH 7,4) ou monocrotalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) nas doses de 50, 100, 150 mg/Kg por via intraperitoneal, em dose única, e na dose de 50 mg/Kg por 3 semanas consecutivas. A diluição da monocrotalina, foi feita nas doses escolhidas para 1 mL de volume final, sendo realizadas em 0,5 mL de HCl 1N. Após solubilizar, o pH foi ajustado até atingir 7,4 com adição de NaOH 1 N e, para complementar o volume final foi acrescentado NaCl 0,9% (FARAHMAND, F. et al, 2004).

### 2.4- Eutanásia e coleta das amostras

Os animais foram anestesiados com isoflurano (dose ao efeito) por via inalatória, em seguida foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os tecidos (coração e pulmão) foram coletados para análises posteriores.

### 2.5- Análises histológicas

O coração e os pulmões foram fixados em formalina tamponada a 10%, processadas em concentrações crescentes de álcool e xanol e parafinizados em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Feito isso, as amostras foram cortadas em seções de 3 µm (pulmão) e 4 µm (VD e VE) de espessura, fixadas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscópio (BRUCE et al., 2015; LI et al., 2013). Posteriormente, as lâminas foram analisadas e as imagens capturadas utilizando o microscópio Leypzig em associação à câmera Moticam 5MP e ao software Motic Images plus 2.0.

Definiu-se como critérios de análise das lâminas histológicas e coleta de imagens:

- Cardiomiócitos: a coleta de imagens procedeu-se na direção do ápice para base cardíaca tanto nas lâminas de corte longitudinal quanto nas lâminas de corte transversal, sendo efetuada dez capturas de imagens contendo dez cardiomiócitos cada totalizando cem cardiomiócitos por animal. O aumento utilizado para captura das imagens dos cardiomiócito foi de 400x
- Arteríolas pulmonares: a coleta de imagens procedeu-se na direção da porção inferior para porção superior do corte histológico usando para isso apenas lâminas em corte longitudinal, sendo efetuada cinco capturas de imagens contendo uma arteríola cada com diâmetro externo menor do que 200 µm totalizando cinco arteríolas pulmonares por animal. O aumento utilizado para captar de imagens das arteríolas pulmonares foi de 200x.
- Área cardíaca total: a coleta de imagem foi realizada por meio de escaneamento das lâminas cardíacas em corte transversal

## 2.6- Medidas

Para a aferição das medidas utilizou-se o programa Image J, sendo coletadas as seguintes informações para cada animal:

- Cardiomiócitos: área total de cem cardiomiócitos
- Áreas cardíacas totais: área cardíaca total, área do ventrículo direito, área do ventrículo esquerdo, área da câmara ventricular direita e espessura da parede do ventrículo direito. Para medição da espessura do VD convencionou-se utilizar a porção da parede que, visualmente na imagem capturada, tivesse maior espessura.
- Arteríolas pulmonares: diâmetro total, diâmetro da luz, espessura da parede e espessura da camada média para cinco arteríolas pulmonares
  1. Todas as medidas foram dadas em micrômetros.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise das áreas dos cardiomiócitos (Figura 1) verificou-se aumento dessas células nos grupos tratados quando comparado aos dados do grupo controle, sobretudo no grupo MCT 150. Em animais do grupo controle (CNT) sem indução de hipertensão pulmonar, a média da área dos cardiomiócitos em  $\mu\text{m}^2$  foi de  $(210538 \pm 30,7)$ , enquanto nos grupos tratados foi de  $(269698 \pm 21,6)$  para o MCT50, de  $(236570 \pm 27,1)$  para o MCT100, de  $(355067 \pm 72,9)$  para o MCT150 e de  $(256493 \pm 32,4)$  para o MCT50 3x. O resultado preliminar da variável “área de cardiomiócitos” encontrado no modelo experimental utilizado nesse estudo vai ao encontro da literatura atual para modelos de indução da HAP com uso de MCT em ratos, mas ainda carece de maiores análises, uma vez que o baixo número amostral impediu a realização da análise estatística.

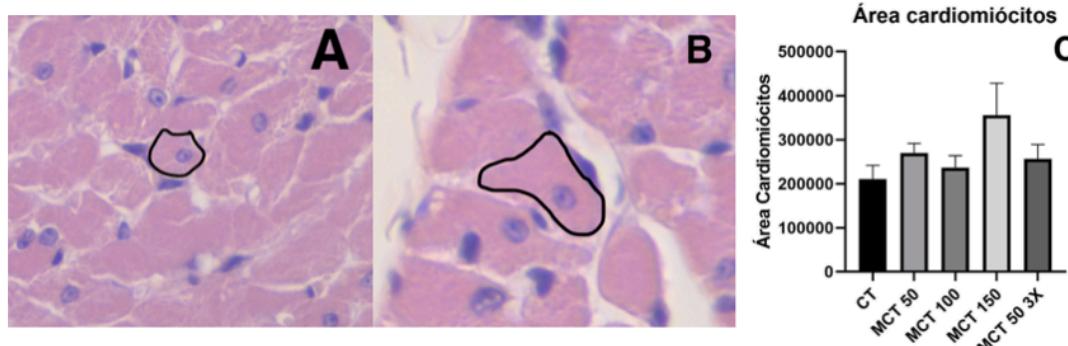


Figura 1. A- área de cardiomiócito do grupo CT em corte histológico longitudinal corados em H.E com aumento de 400x. B- área de cardiomiócito do grupo MCT150 em corte histológico longitudinal corados em H.E com aumento de 400x. C- gráfico de barras mostrando a distribuição das médias das áreas dos cardimíócitos entre os grupos estudados.

Dentre as variáveis analisadas nas áreas cardíacas totais, a área do ventrículo direito foi a única que aparentemente mostrou-se com maior variabilidade entre os grupos. Entre os animais do grupo controle, a média da área do ventrículo direito em  $\text{cm}^2$  foi de 38,976 enquanto nos grupos que receberam intervenção foi de 48,596 para o grupo MCT50, de 53,4156 para o grupo MCT100, e de 46,594 para o grupo MCT50 3x. As análises preliminares das variáveis das áreas cardíacas (área cardíaca total, área do ventrículo

esquerdo, área da câmara ventricular direita, espessura da parede do ventrículo direito) e das arteríolas pulmonares (diâmetro total, diâmetro da luz, espessura da parede e espessura da camada média), aparentemente, não demonstraram oscilações significativas entre os valores encontrados nos grupo que receberam o tratamento em relação ao grupo controle. Desse modo, cabe estudos subsequentes com aumento do número amostral para que se possa melhor estabelecer relações entre os grupos, uma vez que o presente estudo trata-se de um modelo piloto na indução de HAP.

#### 4. CONCLUSÕES

O dados obtidos até o momento no presente estudo indicam que a hipertrofia dos cardiomiócitos foi mais evidente quando utilizada 150mg de MCT em dose única via intraperitoneal. Além disso, as alterações observadas sugerem que o modelo experimental de indução da HAP com uso de MCT em camundongos se aproxima dos modelos de indução em ratos, no entanto, é necessária a continuidade da pesquisa de forma a avaliar se esse novo modelo mimetiza as demais variáveis experimentais de forma efetiva e eficiente. Para isso, é indispensável o aumento do número de animais nesse experimento para que se consiga melhor avaliar as relações entre as variáveis estudadas até aqui.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRETO, Alessandra Costa, et al. "Hipertensão arterial pulmonar: fisiopatologia, aspectos genéticos e resposta ao uso crônico do sildenafil." Arquivos Brasileiros de Cardiologia 85 (2005): 147-154.
- BRANCO G. (2023). A ação vasodilatadora do extrato de cogumelo Pleurotus albidus em artérias pulmonares de ratos wistar é atenuada na hipertensão arterial pulmonar induzida por monocrotalina. Ufrgs.br. <http://hdl.handle.net/10183/271588>
- DEGRANDIS, F. T. Ação do cogumelo Pleurotus ostreatus sobre a regulação glicêmica em camundongos C57BL/6 saudáveis. Ufpel.edu.br, 2021.
- ECHER E. (2019) .Influência da incubação in vitro com extrato de Pleurotus albidus no estresse oxidativo cardiovascular e na reatividade vascular. Ufrgs.br. <http://hdl.handle.net/10183/210539>
- FARAHMAND, F.; HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. Molecular and cellular biochemistry, v. 260, n. 1-2, p. 21-29, maio 2004
- GALIÈ N. Et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2004
- KAREN, S. (2022). Efeito da suplementação com extrato de Pleurotus albidus na resistência insulínica. Ufpel.edu.br. <http://guaiaca.ufpel.edu.br/xmlui/handle/prefix/9822>
- QUEVEDO, P. Influência do extrato de Pleurotus ostreatus na absorção intestinal de glicose pelo transportador de sódio glicose do tipo 1 em camundongos C57BL/6. Ufpel.edu.br. <http://guaiaca.ufpel.edu.br/xmlui/handle/prefix/9827> (2023)
- SILVEIRA, T (2022). Efeito do extrato de Pleurotus ostreatus sobre a glicemia de camundongos fêmeas. Ufpel.edu.br. <http://guaiaca.ufpel.edu.br/handle/prefix/8638>