
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL - PUCRS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E
SAÚDE DA CRIANÇA

**SILDENAFIL REVERTE O FENÔMENO
DA VASOCONSTRICÇÃO PULMONAR
HIPÓXICA EM PORCOS RECÉM-
NASCIDOS**

Rogério Blasbalg Tessler

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Medicina da PUCRS para obtenção de
título de Doutor em Medicina/Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Renato Machado Fiori

Porto Alegre, 2008

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

T341s Tessler, Rogério Blasbalg

Sildenafil reverte o fenômeno da vasoconstrição pulmonar hipóxica em porcos recém-nascidos / Rogério Blasbalg Tessle; orient. Renato Machado Fiori; co-orient. Jaques Belik. Porto Alegre: PUCRS; 2008.

93f.: il. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina. Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança.

1. SISTEMA VASOMOTOR/efeito de drogas. 2. OXIGENAÇÃO. 3. SÍNDROME DA PERSISTÊNCIA DO PADRÃO DE CIRCULAÇÃO FETAL. 4. SUÍNOS. 5. ANIMAIS RECÉM-NASCIDOS. 6. VASOCONSTRIÇÃO/efeito de drogas. 7. MODELOS ANIMAIS DE DOENÇAS. 8. ANIMAIS. 9. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA. I. Fiori, Renato Machado. II. Título.

C.D.D. 616.132
C.D.U. 612.146:636.4(043.2)
N.L.M. WS 421

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB10/196

DOUTORANDO: ROGÉRIO BLASBALG TESSLER

ENDEREÇO: Rodovia João Paulo 432, Bloco A-306

BAIRRO: João Paulo / Florianópolis

e-mail: tessler@hu.ufsc.br

TELEFONE: (048) 33348557

ÓRGÃO FINANCIADOR: CAPES

CONFLITO DE INTERESSES: NENHUM

Dedicatória

Ao meu pai Salomão Faimberg Tessler, um grande homem, um grande pai, um grande médico, que há alguns anos vem dia a dia lutando e vencendo, exemplo a nós mais jovens, de força, caráter e determinação.

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Renato Machado Fiori e Jaques Belik pela brilhante colaboração, apoio estímulo, carinho e compreensão nesse que sem duvida é um dos momentos mais marcantes de minha vida.

A Jingyi Pan, Dongge Li, Darakhshanda Shehnaz e Omar Farah pelo carinho com que me receberam no laboratório e por não terem medido esforços em introduzir um medico, no mundo das células, da bioquímica e da ciência básica.

A Shengping Wu e Christopher Macgowan pela confecção, execução e interpretação do protocolo de imagem.

A toda equipe do *Lung Biology Department (University of Toronto)*, em especial aos técnicos e estudantes do laboratório do Dr. Jaques belik.

A Marvin Strada pela indispensável ajuda com o manejo dos animais.

A minha mãe Rosali Tessler e ao meu primo Eduardo Tessler pela revisão final do manuscrito.

Aos meus pais Salomão e Rosali Tessler que vibram, torcem é celebram cada uma de minhas conquistas.

A parte da família Tessler de Porto Alegre, Abraão e Eduardo, que sempre me recebem com os braços e corações abertos.

A amiga Lúcia Nukumizu que me acompanhou de perto nas longas horas passadas dentro do laboratório.

Aos colegas do hospital da Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio e compreensão.

A CAPES pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv

CAPÍTULO I

1 REFERENCIAL TEÓRICO	2
1.1 Transição Perinatal Imediata.....	2
1.1.1 Adaptação Respiratória	3
1.1.2 Adaptação Circulatória	5
1.1.3 Adaptação Térmica.....	7
1.1.4 Adaptação Metabólica	8
1.2 Hipertensão Pulmonar Persistente do Recém Nascido	9
1.3 Via Óxido Nítrico - Monofosfato Cíclico de Guanosina	13
1.4 Sildenafil.....	18

1.5 Fisiologia das Trocas Gasosas	23
1.6 Hipóxia Pulmonar Vasoconstrictora	26
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
4 REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO II

5 MATERIAIS E MÉTODOS	52
5.1 Animais	52
5.2 Ventilação Mecânica e Medidas Hemodinâmicas	53
5.3 Atelectasia do Lobo Inferior Direito	54
5.4 Ressonância Magnética Nuclear	55
5.5 Análise e Quantificação do Fluxo Sangüíneo	57
5.6 Administração do Sildenafil.....	58
5.7 Conteúdo de cGMP no Parênquima Pulmonar	59
5.8 Analise Estatística	60
6 REFERÊNCIAS	61

CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL	64
------------------------------	-----------

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES.....	93
------------------------	-----------

APÊNDICE

APÊNDICE	ii
-----------------------	-----------

LISTA DE TABELA

Table- Hemodynamic, pH and arterial oxygenation changes following right lower lobe atelectasis.....	85
------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

- 1 Newborn pig chest fluoroscopy illustrating the placement of the bronchus occluder catheter in the right lung (left panel) and the resulting right lower lobe atelectasis on postmortem assessment (right panel).....86
 - 2 Representative MR blood-flow measurement in one animal.
(a) Anatomical slice depicting the artery feeding the right lower segment of the lung (arrow). **(b)** Two velocity maps corresponding to the boxed area in (a) but taken from different points in the cardiac cycle: systolic flow (top) and diastolic flow (bottom). Bright pixels indicate superior flow and dark pixels inferior flow. **(c)** Blood flow measured in the feeding artery before (circles) and after (triangles) atelectasis of the right lower segment of the lung. Flow integrated over the cardiac cycle was approximately 1.0 ml and 0.3 ml before and after collapse, respectively.....87
 - 3 Mean systemic and pulmonary arterial pressures prior (control) (N=9), and 30 min after 0.2 (N=10) and 1 mg/kg (N=14) sildenafil iv administration. ** P<0.01 as compared with control values. * * P<0.01 as compared with 0.2 mg/kg dose88
-

- 4 Atelectatic, contra-lateral lobes and total pulmonary blood flow prior (control) (N=3) and 30 min after 0.2 (N=3) and 1 mg/kg (N=3) sildenafil iv. ** P<0.01 as compared with control values89
 - 5 Pulmonary and systemic vascular resistance changes for control (N=6), 0.2 (N=5) and 1 mg/kg (N=4) sildenafil administration90
 - 6 Arterial oxygen tension (PaO₂) prior (control) (N=9), and 30 min after 0.2 (N=10) and 1 mg/kg (N=14) sildenafil iv administration. ** P<0.01 as compared with control values91
-

LISTA DE ABREVIATURAS

cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina
cGMP	Monofosfato Cíclico de Guanosina
CRF	Capacidade Residual Funcional
DC	Débito Cardíaco
FDE	Fosfodiesterase
FiO₂	Fração Inspirada de Oxigênio
HPP	Hipertensão Pulmonar Persistente
HPV	Hipóxia Pulmonar Vasoconstritora
NO	Óxido Nítrico
NOi	Óxido Nítrico Inalatório
NOs	Óxido Nítrico Sintase
PaCO₂	Pressão Parcial de gás carbonico
PaO₂	Pressão Parcial de oxigênio
V/Q	Relação Ventilação/Perfusão
VD	Ventrículo Direito

RESUMO

O sildenafil é um potente vasodilatador usado no tratamento da hipertensão pulmonar persistente do recém nascido, entretanto existe conflito sobre os dados referentes ao efeito sobre a oxigenação. Testamos o efeito sobre a vasoconstrição pulmonar hipóxica (HPV) em porcos recém nascidos. Um segmento do pulmão atelectático foi criado através da obstrução de um brônquio. O fluxo sanguíneo total e o fluxo local para o lobo atelectático e o lobo contra-lateral foram mensurados através da ressonância magnética nuclear (MRI), 30 minutos e após a administração de sildenafil (0.2 e 1mg/kg ev) ou solução salina. O fluxo estava reduzido ($P < 0.01$) no lobo atelectático e aumentado no lobo contra-lateral, indicando uma resposta da HPV adequada. Sildenafil nas doses oferecidas significativamente ($P < 0.01$) aumenta o fluxo local para o lobo atelectático. Na dose de 1mg/Kg causa uma diminuição da PaO_2 de 285 ± 37 para 161 ± 22 mmHg ($P < 0.01$). Nós concluímos que o recém nascido apresenta uma resposta HPV adequada, que interrompe quase por completo o fluxo de sangue para áreas não ventiladas do pulmão. Esse fenômeno é revertido após a administração do sildenafil endovenoso de forma dose dependente. Na presença de doença do parênquima pulmonar, o uso de sildenafil endovenoso para o tratamento de hipertensão pulmonar pode piorar a oxigenação através da reversão da resposta pulmonar vasoconstritora nas áreas não ventiladas do pulmão.

ABSTRACT

Sildenafil is a vasodilator used in the treatment of persistent pulmonary hypertension of the neonate (PPHN) syndrome, but conflicting data exist regarding its effect on arterial oxygenation. We tested its effect on the piglet's hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) response. A segmental lung atelectasis was created by obstructing the corresponding bronchus. Total pulmonary and specific flows to the atelectatic and contra-lateral lobes were measured by magnetic resonance (MR) before and 30 min post sildenafil (0.2 and 1mg/kg iv) or saline administration. Flow was reduced ($P<0.01$) in the atelectatic and increased in the contra-lateral lobe indicating an effective HPV response. Sildenafil at both doses significantly ($P<0.01$) increased flow solely to the atelectatic lobe. At a dose of 1 mg/kg sildenafil induced a decrease in PaO_2 from 285 ± 37 to 161 ± 22 mmHg ($P<0.01$). We conclude that the HPV response in the newborn is capable of almost completely reducing blood flow to nonventilated lung units and is reversed following sildenafil iv administration in a dose-dependent manner. In the presence of lung parenchymal disease, the use of iv sildenafil in the treatment of PPHN syndrome may worsen arterial oxygenation by reversing the HPV response in non-ventilated lung units.

CAPÍTULO I

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Transição Perinatal Imediata

A adaptação à vida extra-uterina, também chamada de transição perinatal imediata, envolve praticamente todos os órgãos e sistemas do organismo. Os eventos cruciais mais importantes são:

- 1) conversão do pulmão inicialmente ocupado por líquido em um órgão distensível, capaz de realizar trocas gasosas;
 - 2) estabelecimento da circulação tipo “adulto”;
 - 3) separação do útero (ambiente térmico neutro);
 - 4) estabilização metabólica extra-uterina.¹
-

1.1.1 Adaptação Respiratória

O desenvolvimento pulmonar humano passa pela fase pseudo-glandular (5-17 semanas), canalicular (16-26 semanas), sacular (24-38 semanas) e finalmente alveolar (36 semanas - 2 anos). Durante o desenvolvimento intra-uterino o pulmão é ocupado por líquido secretado pelo próprio epitélio pulmonar. O volume e a velocidade com que esse líquido é secretado estão “programados” para manter o volume do pulmão próximo da capacidade residual funcional e é o maior determinante para o desenvolvimento pulmonar normal.²

Nas horas que precedem o nascimento a secreção pulmonar diminui e o início do trabalho de parto geralmente estimula a secreção de adrenalina pelo feto e a produção de hormônio liberador de tireotrofina pela mãe. Essa modificação hormonal induz o epitélio pulmonar fetal a iniciar a reabsorção do líquido dos espaços alveolares preparando o feto para as primeiras incursões respiratórias. A liberação materna de tireotoxina e glucocorticóides estimula também a liberação de adrenalina e aumenta a reabsorção do líquido pulmonar.³ Após o nascimento há um aumento na reabsorção ativa do líquido pulmonar, sendo que a maior parte desse líquido já estará totalmente absorvida após 2 horas de vida em recém-nascidos de termo. A absorção desse líquido é alcançada graças a um complexo mecanismo de transporte iônico na membrana do epitélio pulmonar, que envolve entre outros a bomba de sódio

situada na parede da membrana celular.⁴

A introdução de ar nos pulmões e a criação da interface ar/líquido, facilitada pela presença do surfactante, minimiza a tensão superficial e previne o colapso das vias aéreas menores facilitando a expansão pulmonar. O mecanismo de absorção do líquido pulmonar se desenvolve somente no final da gestação, sendo que os bebês prematuros podem ter dificuldade em manter a capacidade residual funcional, não somente pela falta de surfactante, mas também pela impossibilidade de reabsorção desse fluido pulmonar.

Outro evento pulmonar importante durante a transição perinatal é a mudança da “respiração” fetal (movimentos torácicos intra-uterinos), para a ventilação espontânea normal. Essa ventilação é iniciada por uma série de estímulos principalmente tácteis e térmicos, mas também por quimiorreceptores que “sentem” as mudanças de pH e oxigenação sanguíneos. Os primeiros movimentos ventilatórios são extremamente importantes em preencher de ar o pulmão, inicialmente cheio de líquido, sendo que o bebê deve gerar pressões negativas de até -100 cm de água para mover o ar de áreas de alta pressão para áreas de mais baixa pressão. Esse esforço inicial é 10 a 15 vezes maior que o necessário posteriormente, mas imprescindível para superar a viscosidade do líquido que ocupa a via aérea e a resistência da caixa torácica como um todo. Uma vez estabelecida a ventilação, mínimas serão as pressões negativas necessárias para superar a resistência das vias aéreas e a elasticidade normal do sistema respiratório.⁵

O processo de respiração normal geralmente “ocupa” 1/3 da capacidade pulmonar, sendo que os 2/3 restantes funcionam como reserva. O volume de gás restante no final da expiração normal quando o sistema respiratório está em repouso (capacidade residual funcional – CRF) é a que melhor reapresenta a capacidade pulmonar. Uma manutenção adequada da CRF garante a otimização da mecânica pulmonar e uma área alveolar suficiente para as trocas gasosas.⁶

Durante a transição, as trocas gasosas ocorrem na interface ar/líquido do epitélio alveolar. A instituição de uma ventilação adequada após o nascimento facilita as trocas gasosas através do efeito sobre a redução da resistência vascular pulmonar, sobre o estabelecimento de uma CRF adequada e na manutenção de um volume corrente ótimo, na tentativa de manter o trabalho respiratório o menor possível.

1.1.2 Adaptação Circulatória

A placenta é o órgão encarregado pelas trocas gasosas durante a vida fetal. A circulação é modificada para acomodar a perfusão da placenta de modo que o sangue fetal com conteúdo maior de oxigênio perfunde o cérebro/coração

e o sangue menos saturado de oxigênio seja desviado para as porções inferiores do corpo e a própria placenta. Isso se dá através da criação de *shunts*, que favorecem o fluxo em direção da placenta, que graças a sua particular anatomia vascular (sinusóides) apresenta uma baixa resistência ao fluxo sanguíneo.⁷

Por outro lado, a resistência vascular pulmonar é extremamente alta em função do colapso dos pulmões e da “muscularização” das arteríolas. O desvio do sangue ocorre através do *foramen ovale* e do *ductus arteriosus* que conectam a aorta com a artéria pulmonar. Sangue oxigenado retorna da placenta através da veia umbilical em direção ao átrio direito, onde boa parte, em vez de ser bombeado em direção ao pulmão é desviado para o átrio esquerdo e posteriormente para a aorta. O restante do sangue segue ao ventrículo direito e é bombeado através da artéria pulmonar para a aorta descendente via *ductus arteriosus*. Somente 8% do débito do ventrículo direito efetivamente alcançam os pulmões.¹

Nas primeiras horas de vida ocorre uma queda progressiva na pressão da artéria pulmonar e, conseqüentemente, um aumento em até dez vezes na quantidade de sangue que chega aos pulmões.⁸ Esse processo é mediado pela distensão dos pulmões, aumento da oxigenação, produção endógena de óxido nítrico, prostaglandina I₂, bradicinina e por mudanças endócrinas próprias da parturiente.³ Com a queda da resistência vascular pulmonar, aumento na pressão do átrio esquerdo e queda na pressão de enchimento do átrio direito, o

foramen ovale tende a se fechar logo após o clampeamento da veia umbilical. A queda na pressão da artéria pulmonar, associada a um aumento na pressão no território vascular sistêmico ainda nos primeiros dias de vida, inverte o fluxo no *ductus arteriosus* (esquerda – direita), terminando pelo seu fechamento. O fluxo pelo *ductus venosus* (veia umbilical → veia cava inferior) persiste ainda pelas primeiras três semanas de vida e pode se perpetuar por mais tempo em bebês prematuros.

1.1.3 Adaptação Térmica

Ao nascimento os recém nascidos apresentam uma relação maior entre superfície e massa corpórea, o que facilita a perda de calor. Eles nascem molhados, em ambientes relativamente frios, depois de terem sido mantidos aquecidos dentro do útero até o nascimento. A termogênese fetal é normalmente inativa, porém a produção basal de calor é duas vezes maior que de um adulto. Após o nascimento a temperatura cai e os recém nascidos respondem aumentando o consumo de oxigênio, utilizando como fonte de energia a gordura marrom.⁹

Como resposta ao frio, existe um aumento progressivo da atividade simpática com liberação de noradrenalina e aumento da atividade da lipase para mobilização dos ácidos graxos. O frio pode aumentar o consumo de oxigênio em até 100% e a hipóxia pode inibir quase que por completo a termogênese.¹⁰

1.1.4 Adaptação Metabólica

O armazenamento de glicogênio no fígado fetal se dá durante toda a gestação. Há um aumento importante no acúmulo de glicogênio a partir da 36ª semana, onde ele se deposita em grande quantidade no músculo e no coração. Durante o nascimento as concentrações plasmáticas de adrenalina, noradrenalina e glucagon aumentam rapidamente enquanto as concentrações de insulina declinam, garantindo então a mobilização de glicogênio e ácidos graxo para produção de energia.¹¹

O nascimento marca um momento de mudanças extraordinárias onde as trocas gasosas que se faziam através da placenta passam então a serem feitas pelos pulmões do recém-nascido. Esse período de transição é de grande importância para o início da vida extra-uterina e depende de vários eventos que

normalmente sucedem o nascimento.

Uma bem sucedida transição perinatal envolve entre outros fatores a distensão rítmica dos pulmões, mudanças na pressão parcial de oxigênio, o estabelecimento de uma interface ar-líquido e a liberação de mediadores vasoativos.¹² A distensão dos pulmões com ar aumenta a capacidade dos vasos pulmonares em receber o sangue proveniente do débito cardíaco do ventrículo direito através da diminuição do fluxo turbilhonado nesses vasos, até então mecanicamente “pinçados”.³

Quando por alguma razão essa transição é perturbada e a queda esperada da resistência vascular pulmonar não se processa, ficam então criadas as condições para o aparecimento da persistência da circulação fetal ou hipertensão pulmonar própria do recém nascido.

1.2 Hipertensão Pulmonar Persistente do Recém Nascido

A Hipertensão Pulmonar (HP) própria do recém nascido é uma patologia freqüente caracterizada por uma elevada pressão na artéria pulmonar e reatividade anormal dos vasos pulmonares. Independente de sua etiologia, a hipertensão pulmonar própria do recém nascido está associada a uma falência da adaptação circulatória após o nascimento. A alta resistência vascular

pulmonar resulta em desvio de sangue não oxigenado pelo *ductus arteriosus* e *foramen ovale*, causando hipoxemia e acidose.⁶

O aumento da resistência vascular pulmonar pode ser resultado da angiogênese inadequada dos vasos pulmonares, de uma disfunção endotelial que leva a um desequilíbrio entre fatores endógenos vasoconstrictores e vasodilatadores, de uma reatividade exagerada dos vasos pulmonares ou então de uma associação desses fatores.¹³

As alterações do relaxamento vascular pulmonar envolvem não só a reorganização do cisto esqueleto, mas também do “maquinário” responsável pelos fenômenos de contração/relaxamento vascular que parece estar em um estado de baixo consumo de energia (latência) durante o período intra-uterino.³ A reorganização do cisto esqueleto se refere ao mau desenvolvimento dos vasos pulmonares em resposta a hipóxia crônica intra-útero que se manifesta por uma excessiva “muscularização” das arteríolas pulmonares assim como a extensão dessa musculatura para arteríolas intra-acinares, que normalmente não deveriam apresentar musculatura lisa.¹³

Acomete em média três bebês para cada 1.000 nascidos vivos, com uma mortalidade que alcança 20% nos casos mais graves.⁶ A hipoxemia resultante da insuficiência respiratória está presente em 80.000 recém nascidos por ano nos Estados Unidos, provocando um gasto hospitalar de mais de quatro bilhões de dólares/ano.¹⁴

Do ponto de vista hemodinâmico, a HP é definida como uma pressão média da artéria pulmonar maior que 25 mmHg. Além do *shunt* de sangue pelo *ductus arteriosus* e/ou *foramen ovale*, a reatividade exagerada dos vasos pulmonares causa restrição do débito cardíaco e disfunção miocárdica direita associada a uma pós-carga pulmonar elevada.¹⁵ A mais grave das situações cardíacas descritas envolve um *shunt* intra-cardíaco tão volumoso que interfere no enchimento ventricular esquerdo, resultando em fluxo reverso no arco aórtico.³

As anormalidades do septo interventricular são características de sobrecarga (pressórica/volumétrica) do ventrículo direito (VD). Ambas as cavidades ventriculares sofrem um remodelamento devido a um deslocamento lateral da direita para a esquerda do septo interventricular. Esse fenômeno associado ao fato de que o ventrículo direito apresenta dificuldade em se esvaziar na circulação pulmonar, visto que essa apresenta pressões eventualmente superiores às pressões sistêmicas, explica a disfunção ventricular direita e a incapacidade do VD em se relaxar adequadamente, permitindo um enchimento ideal e conseqüentemente, um volume de ejeção adequado. O fluxo pulmonar insuficiente, a diminuição da pré-carga do ventrículo esquerdo e o deslocamento lateral do septo interventricular alteram a dinâmica ventricular esquerda e levam a uma queda do débito cardíaco. Esse fluxo sistêmico baixo, associado a hipoxemia, causam um baixo aporte de oxigênio para os tecidos e, por conseguinte, metabolismo anaeróbico e acidose metabólica.¹

Na hipertensão pulmonar própria do recém-nascido os sintomas se manifestam geralmente nas primeiras 12 horas de vida e freqüentemente existe associação com doença do parênquima pulmonar. As patologias pulmonares mais freqüentes são: aspiração de mecônio, pneumonia, doença da membrana hialina, sepsis, hérnia diafragmática e hipoplasia pulmonar.¹⁶ Walsh-Sukys e colaboradores publicaram um estudo transversal e multicêntrico com quase 400 recém nascidos com diagnóstico de hipertensão pulmonar nos Estados Unidos. Foi descrito que 83% dos casos eram secundários a doenças do parênquima pulmonar e/ou cardíacas, sendo que somente 17% foram considerados hipertensão pulmonar idiopática.¹⁷

Grande atenção tem sido dada à terapêutica e ao desenvolvimento de novas modalidades de tratamento da hipertensão pulmonar própria do recém nascido. A alta mortalidade e a grande morbidade associada ao atraso no desenvolvimento neuro-psico-motor e seqüelas pulmonares, impulsionou os pesquisadores a buscarem drogas que fossem cada vez mais específicas e com menos efeitos indesejáveis.¹⁸

Como se trata de uma patologia que envolve o aumento do tônus vascular e alteração do débito cardíaco, todos os esforços tem sido feito no sentido do desenvolvimento de drogas com propriedades vasodilatadoras e inotrópicas positivas. O efeito vasodilatador da maioria das drogas existentes não é específico sobre os vasos pulmonares, repercutindo muitas vezes sobre a circulação sistêmica levando à hipotensão e piora do *shunt* extrapulmonar. A

tolazolina, os inibidores dos canais de cálcio e o sulfato de magnésio são exemplos de drogas usadas no passado e que caíram em desuso devido à baixa seletividade sobre os vasos pulmonares.¹⁹

1.3 Via Óxido Nítrico - Monofosfato Cíclico de Guanosina

A década de 80 foi marcada por pesquisas intensas e uma atenção maior aos fundamentos fisiológicos do processo de relaxamento vascular pulmonar após o nascimento. Ficou evidente que o endotélio vascular pulmonar, através da elaboração de mediadores vasoativos, modulava a contratilidade e o estado proliferativo das células musculares lisas. Foi a partir daí que se compreendeu que o processo era mediado em parte pelo óxido nítrico (NO), formado a partir do aminoácido L-arginina na presença das três isoformas da enzima óxido nítrico sintase, dentro do endotélio vascular. O NO participa do processo de relaxamento da musculatura lisa dos vasos pulmonares, estimulando a enzima guanilato ciclase solúvel a catalisar a transformação da guanosina trifosfato em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). O cGMP altera a polarização da membrana do endotélio capilar pulmonar impedindo o influxo de cálcio intracelular e promovendo o relaxamento da célula muscular lisa.²⁰ Este processo ativa os canais de K^+

causando hiperpolarização da membrana das células musculares lisas e diminuição do cálcio citosólico.²¹

A descoberta da participação do NO dentro do processo de vasodilatação pulmonar em recém nascidos chamou a atenção dos pesquisadores para essa substância e em poucos anos o NO estava pronto para ser utilizado no tratamento da hipertensão pulmonar. A primeira demonstração de que a terapia com óxido nítrico inalatório era capaz de melhorar a oxigenação em neonatos, sem com isso levar a vasodilatação sistêmica, foi em 1991 na cidade norte-americana de Denver no Colorado.²² Atualmente, é uma alternativa terapêutica usada em larga escala com resultados que variam de acordo com o próprio paciente.

O impacto do óxido nítrico inalatório (NOi) como terapia coadjuvante no tratamento da HP foi dramático, porém não o suficiente para resolver o problema por completo. Com o passar do tempo, percebeu-se que em algumas situações específicas o NOi não promovia o relaxamento da musculatura lisa dos vasos pulmonares como se esperava. Acredita-se que entre 30% a 40% de pacientes neonatais não apresentam resposta satisfatória ao NOi. Estes bebês mostram, em grande parte, uma reatividade vascular exagerada, bem como um aumento da atividade da endotelina-1, potente peptídeo vasoconstrictor com propriedades mitogênicas sobre as células musculares lisas.²³

Embora o NO seja um potente e seletivo vasodilatador pulmonar, seu uso por um período prolongado é problemático, não só pelo alto custo e baixa

meia vida plasmática, mas também por potenciais efeitos deletérios e toxicidade.²⁴ O NO está implicado no desenvolvimento de metahemoglobinemia, no prolongamento do tempo de sangramento e em dano celular causada pela produção de radicais livres de oxigênio e peroxinitritos.²⁵

As observações clínicas sugerem que uma exposição prolongada ao NO exógeno pode ter efeitos negativos sobre a produção endógena do óxido nítrico. Foi demonstrado em estudos experimentais que a exposição prolongada ao NOi diminui a expressão da enzima óxido nítrico sintase no endotélio pulmonar.²⁶ Essa constatação explica, em parte, o efeito “rebote” de aumento da pressão da artéria pulmonar em até 20% dos pacientes, quando da tentativa de retirada ou diminuição do óxido nítrico inalatório. Esse fenômeno pode ser bastante sério, prolongando as necessidades de NOi e com isso, favorecendo o aparecimento de efeitos adversos.²⁷

O cGMP intracelular, por outro lado, é considerado o mais importante mediador responsável pela modulação do tônus vasodilatador pulmonar. A produção do cGMP inicia uma cascata de eventos que culmina com a diminuição do cálcio intracelular, promovendo o relaxamento da musculatura lisa que envolve os vasos pulmonares.²⁸ O cGMP modula o processo de vasodilatação não só através do NO, mas também através da interação de outras substâncias vasoativas como o fator natriurético atrial e o peptídeo natriurético cerebral.²⁹ O fator natriurético atrial, presente em grande quantidade no período neonatal, é responsável pela ativação da enzima guanilato ciclase

na isoforma particulada e pela produção de cGMP e normalização do fluxo pulmonar após o nascimento.²⁹

O cGMP é inativado pela enzima fosfodiesterase (FDE) através de um processo de hidrólise ainda no interior da célula muscular lisa, transformando-se numa forma inerte, o monofosfato de guanossina. Sendo assim, uma alternativa no tratamento da hipertensão pulmonar, seria o aumento da concentração de cGMP usando inibidores da enzima fosfodiesterase.³⁰

A FDE foi descrita até o momento em 11 diferentes formas que diferem entre si principalmente pela afinidade pelo monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) ou pelo cGMP.³⁰ A distribuição das diferentes isoformas pelos mais diversos tecidos humanos já é conhecida, sendo que na circulação pulmonar as isoformas 1, 3, 4 e 5 parecem estar envolvidas na regulação da resistência vascular pulmonar.²⁹

Uma família específica de FDE com especificidade pelo cGMP é a FDE 5. Encontrada em altas concentrações no pulmão, mas também nas artérias coronárias, na circulação venosa, musculatura esquelética e plaquetas.³¹ Os inibidores da FDE 5 agem através da inibição da hidrólise enzimática, competindo pela ligação dos sítios catalíticos da fosfodiesterase com o cGMP.³²

Num modelo animal de hipertensão pulmonar (HP), Hanson e colaboradores demonstraram elevada atividade de FDE 5 quando comparados com um grupo controle.³³ Ratos com HP que receberam E4021, um potente

inibidor da FDE 5, apresentaram aumento de até três vezes na concentração de cGMP e diminuição significativa da pressão na artéria pulmonar.²⁹ Resultado semelhante foi encontrado por Dukarm e colaboradores, que usando a mesma substância, mostraram vasodilatação específica do território pulmonar com mínimo efeito sobre a circulação sistêmica.³⁴ Essa seletividade pelos vasos pulmonares, se dá em parte pela distribuição tecidual da fosfodiesterase 5 encontrada em quantidades superiores na vasculatura pulmonar quando comparada a circulação sistêmica.³⁵

A especificidade dos diferentes tipos de inibidores da FDE 5 sobre os vasos pulmonares é que determina sua eficácia no tratamento da HP. Não só o tipo da droga, mas também a via de administração, deve ser considerada quando se deseja efeito específico sobre o território capilar pulmonar. O dipiridamol, outro inibidor da fosfodiesterase 5, quando usado via endovenosa em animais com HP induzida por infusão exógena de tromboxane A2 é capaz de diminuir a resistência vascular pulmonar em até 35%, efeito esse seguido de vasodilatação sistêmica.³⁶ Esse efeito também foi descrito por Thébaud e colaboradores que administraram dipiridamol (15µg/kg/min) associado à NOi a um recém-nascido portador de hérnia diafragmática e obtiveram, como efeito inicial, melhora da oxigenação seguida de hipotensão sistêmica.²⁰

Porcos recém nascidos, contaminados com *Streptococcus* do grupo B, em um modelo experimental de sepsis e hipertensão pulmonar, apresentaram respostas hemodinâmicas bastante semelhantes quando da infusão de

anrinone, um conhecido inibidor da FDE 3.³⁷

O Zaprinast, um inibidor experimental da FDE 5, tem efeito vasodilatador mais potente e específico sobre os vasos pulmonares que o próprio dipiridamol. Porém, ele também dilata a circulação sistêmica quando usado em doses progressivamente maiores por via endovenosa.²¹ Quando aplicado em carneiros via inalatória, dilata seletivamente os vasos pulmonares sem efeito sobre a resistência vascular periférica.³⁸

1.4 Sildenafil

A descoberta em 1989 do sildenafil, um inibidor seletivo da FDE 5, foi resultado de extensas pesquisas na procura de drogas que tivessem efeito vasodilatador coronariano. Os resultados iniciais não foram promissores no tratamento da angina, mas em contrapartida foi descrita uma melhora da ereção peniana e hoje é usado na população de adultos no tratamento da disfunção erétil. Estudo em adultos saudáveis, conduzido por Kleinsasser e colaboradores, demonstrou que o sildenafil, usado por via oral, tem propriedade vasodilatadora pulmonar.³⁹

Num modelo de hipertensão pulmonar em pacientes adultos

submetidos à hipóxia, houve uma redução de 56% na pressão da artéria pulmonar após a ingestão de 100mg de sildenafil.³¹ O mesmo efeito foi descrito por Shekerdemian e colaboradores em um modelo animal de hipertensão pulmonar induzida por aspiração de mecônio. Foi relatado por eles uma queda na resistência vascular pulmonar de 45% após o uso de sildenafil (2mg/kg), associado a um aumento considerável do débito cardíaco.⁴⁰

Inúmeras publicações confirmaram o efeito vasodilatador pulmonar do sildenafil tanto em recém nascidos como também na população pediátrica e adulta.⁴¹ O sildenafil seguiu sendo usado cada vez em diferentes formas de hipertensão pulmonar. Seus bons resultados em termos de melhora do débito cardíaco e da oxigenação apareceram tanto em pacientes com hipertensão pulmonar hipóxica como naqueles onde já havia alterações anatômicas claras na circulação pulmonar.⁴²

Entretanto, com o passar do tempo e um uso mais disseminado da medicação, percebeu-se um efeito deletério sobre a oxigenação, principalmente em pacientes portadores de hipertensão pulmonar associada a doenças do parênquima pulmonar.⁴³ Esses pacientes estão sujeitos à queda da PaO₂, presumidamente pela vasodilatação de arteríolas que perfundem áreas de parênquima pulmonar mal ventiladas. Sabidamente vasodilatadores pulmonares induzem aumento da fração do *shunt* intrapulmonar o que leva a queda da oxigenação.⁴⁴

Essa complicação já foi devidamente descrita com o uso de drogas

vasodilatadoras não seletivas, gerando grande preocupação quando de seu uso em um contexto terapêutico.⁴⁵

A literatura médica, por sua vez, traz informações conflitantes a esse respeito, onde por um lado registra excelentes resultados em termos de oxigenação e por outro documenta pacientes sofrendo intensa hipoxemia após o uso do sildenafil em presença de pneumopatia associada. Como exemplo, Schulze-Neick e colaboradores demonstraram em pacientes pediátricos portadores de cardiopatia congênita submetidos a estudos hemodinâmicos, que o uso do sildenafil endovenoso era associado com aumento do *shunt* intrapulmonar e queda significativa na pressão parcial de oxigênio.⁴³ Shekerdemian e colaboradores estudaram o efeito do sildenafil em um modelo animal controlado de hipertensão pulmonar induzido por aspiração de mecônio e encontraram claramente uma queda significativa da pressão da artéria pulmonar acompanhada de uma melhora da performance miocárdica, seguida por um aumento importante do índice de oxigenação refletindo uma piora da PaO₂.⁴⁶ O mesmo efeito foi novamente reproduzido em porcos recém nascidos com hipertensão pulmonar induzida por aspiração de mecônio, onde o sildenafil usado via endovenosa (1mg/Kg) apresentou uma normalização da resistência vascular pulmonar seguida de queda importante da oxigenação.⁴⁷

Resultado semelhante foi também reproduzido por Ryhammer e colaboradores que em um modelo suíno de aspiração de mecônio documentaram um aumento do fluxo sanguíneo pulmonar para áreas

atelectáticas do pulmão após o uso endovenoso do sildenafil. Esse aumento do fluxo foi seguido por um aumento do índice de oxigenação proporcional ao aumento da dose do sildenafil oferecida durante o estudo.⁴⁸

Por outro lado, uma extensa literatura foi produzida mostrando resultados diferentes. Ensaio clínico randomizado conduzido com recém nascidos portadores de hipertensão pulmonar demonstrou, apesar de um número pequeno de indivíduos, uma queda importante no índice de oxigenação 6 horas após o uso do sildenafil via gástrica.⁴⁹ Vários trabalhos do tipo “série de casos” vem há muito demonstrando o efeito benéfico do sildenafil no tratamento da hipertensão pulmonar, principalmente em instituições de saúde que não contam com terapia com óxido nítrico inalatório.⁵⁰

O sildenafil usado via endotraqueal vem sendo estudado como alternativa no tratamento da hipertensão pulmonar. Obaid e colaboradores ofereceram sildenafil na dose de 0,5mg/Kg, através do tubo traqueal, a porcos recém nascidos com hipertensão pulmonar induzida por infusão de tromboxane A₂. Nesse estudo, foi comprovado o efeito vasodilatador pulmonar do sildenafil intra-traqueal através da queda da resistência vascular pulmonar e da pressão da artéria pulmonar, sem contudo interferir negativamente na oxigenação.⁵¹ Esse efeito pode ser explicado pelo fato de que o sildenafil age somente nas áreas bem ventiladas do pulmão, não alterando a relação ventilação perfusão alveolar (V/Q). O mesmo resultado foi encontrado com o sildenafil nebulizado em carneiros com hipertensão pulmonar induzida também por tromboxane A₂.

Nessa situação houve uma queda significativa da resistência vascular pulmonar, sem prejuízo a oxigenação.⁵²

O mecanismo que explica a hipoxemia durante o tratamento sistêmico com sildenafil na hipertensão pulmonar associada à doença do parênquima pulmonar foi extensamente estudado, porém novamente observaram-se resultados conflitantes. Ghofrani e colaboradores, estudando pacientes portadores de hipertensão pulmonar secundária à fibrose pulmonar, não encontraram aumento do *shunt* intrapulmonar, muito menos piora da oxigenação após o uso do sildenafil. O *shunt* foi adequadamente aferido pela técnica dos gases inertes (Miget test) e o uso do sildenafil na dose de 50 mg, considerado seguro.⁵³ Especula-se um efeito vasodilatador específico sobre áreas do pulmão mais aeradas, potencializando um efeito vaso-regulatório local.

Em contrapartida, existem fortes evidências mostrando que o sildenafil aumenta o *shunt* intrapulmonar e, por conseguinte, deflagra quadros de hipoxemia. Kleinsasser e colaboradores, usando a mesma técnica dos gases inertes, documentaram que o sildenafil usado em doses tão baixas como 1mg/kg via gástrica foi capaz de aumentar o fluxo sanguíneo para áreas do pulmão com V/Q zero e diminuir o fluxo de sangue para áreas com V/Q normal. Esse fenômeno era acompanhado de hipoxemia, assim como também de aumento significativo do débito cardíaco.⁵⁴

Resultado semelhante foi reproduzido em um modelo animal de

aspiração de mecônio, onde o fluxo sanguíneo de quatro diferentes partes do pulmão (apical, basal, anterior, posterior) sofreram influência do sildenafil. Nesse experimento, o sildenafil na dose de 0,2mg/Kg foi capaz de aumentar significativamente o fluxo nessas quatro diferentes áreas, fluxo esse aferido via ressonância magnética nuclear.⁵⁵

Fica claro então, a falta de uniformidade das informações disponíveis na literatura medica sobre o efeito do sildenafil no fluxo sangüíneo pulmonar, principalmente para determinadas áreas onde o fluxo fisiologicamente deveria estar diminuído em função da resposta pulmonar vasoconstrictora.

1.5 Fisiologia das Trocas Gasosas

Em uma situação ideal, a ventilação de uma determinada área do pulmão deveria ser suficiente para promover a troca total de oxigênio e gás carbônico do sangue que esta perfundindo esta área. Na situação real, nem a ventilação nem a perfusão estão distribuídas de maneira uniforme por todo o pulmão. Sabe-se que as bases são mais perfundidas e ventiladas que os ápices pulmonares.⁵⁶

A distribuição da perfusão através do pulmão sofre grande interferência da gravidade. Isso significa dizer que a perfusão das bases pulmonares com o

indivíduo em posição ereta é igual a pressão média da artéria pulmonar (20cmH₂O) mais a pressão hidrostática entre o tronco da pulmonar e a base do pulmão (15cmH₂O). Nos ápices a pressão hidrostática é subtraída da pressão da artéria pulmonar resultando em uma pressão de perfusão muito baixa, que pode em vários momentos ser menor que a pressão alveolar, causando compressão dos vasos e intermitente obstrução do fluxo sanguíneo.⁵⁷

A distribuição da ventilação esta relacionada à posição de cada área pulmonar na curva de complacência no começo de uma inspiração normal. Devido ao fato das bases pulmonares estarem em uma parte mais favorável da curva de complacência, elas acabam recebendo um volume maior para cada mudança de pressão aplicada e assim recebem um grau maior de ventilação.⁵⁸

Embora as diferenças encontradas entre as bases pulmonares e os ápices em termos de ventilação serem menores do que em termos de perfusão, de maneira geral existe uma boa relação global entre a ventilação e a perfusão (V/Q), alcançando assim uma adequada troca gasosa quando da passagem dos sangue pelos pulmões.

Distúrbios da distribuição da ventilação ou da perfusão podem levar a grave hipoxemia. Para uma área em que exista uma baixa V/Q, o sangue fluindo através desse segmento vai ser incompletamente oxigenado. A hipoxemia, nesses casos, pode ser corrigida através de um aporte maior de oxigênio inspirado, o que de certa forma restaura a concentração de oxigênio alveolar a um ponto suficiente para oxigenar todo o sangue circulante.⁵⁹

Problemas na relação ventilação/perfusão ocorrem de forma bastante comum durante a anestesia inalatória devida à queda da capacidade residual funcional, o que leva a uma mudança na posição do pulmão na curva de complacência. Os ápices então se movem para a parte mais favorável da curva enquanto as bases ficam localizadas na porção inferior, menos favorável da curva.⁶⁰

Nas situações extremas de desequilíbrio na relação ventilação/perfusão, a área afetada do pulmão terá uma relação que tende para o infinito e é chamada de espaço morto alveolar. Somado ao espaço morto anatômico, recebe então o nome de espaço morto fisiológico e é considerada uma área onde a ventilação é desperdiçada.⁶¹

Em situações onde ao contrário uma determinada área do pulmão não recebe ventilação devido a um bloqueio da via aérea, a relação ventilação/perfusão será zero, sendo essa área designada como *shunt*. O sangue sairá dessa área com a mesma PaO₂ venosa, produzindo uma extrema hipoxemia. Essa hipoxemia não pode ser corrigida através do aumento da fração inspirada de oxigênio, visto que essa área de *shunt* não recebe ventilação adequada. As áreas bem ventiladas do pulmão, muitas vezes, não conseguem compensar a hipoxemia pelo fato de que em situações normais, a hemoglobina é totalmente saturada quando a PaO₂ está normal. Aumentos da PaO₂ sanguínea não irão aumentar substancialmente o conteúdo de oxigênio.⁶² Nessas situações, uma adequada oxigenação só pode ser restabelecida através da restauração da

ventilação usando-se medidas como fisioterapia, PEEP ou CPAP, que em última análise provocam o recrutamento dessas áreas pulmonares colapsadas.⁶³

1.6 Hipóxia Pulmonar Vasoconstrictora

Hipóxia pulmonar vasoconstrictora (HPV) é uma resposta vasomotora adaptativa a hipóxia alveolar, que redistribui o sangue para segmentos do pulmão adequadamente ventilados através de um processo ativo de vasoconstrição que envolve particularmente pequenos vasos pulmonares.⁶⁴

O sangue é desviado de áreas pobres em oxigênio para segmentos do pulmão adequadamente ventilados, melhorando a relação ventilação/perfusão, diminuindo o *shunt* intrapulmonar e aumentando o aporte de oxigênio sistêmico em condições como atelectasia e pneumonia.⁶⁵ O fenômeno da HPV começa a se instalar segundos após a instalação da hipóxia e rapidamente é revertido após a restauração da ventilação normóxica.⁶⁶

A primeira observação moderna do fenômeno da HPV ocorreu em 1894 quando Bradford e Dean descreveram um aumento da pressão da artéria pulmonar em resposta a asfixia.⁶⁷ Meio século depois, a HPV foi reconhecida como um fenômeno adaptativo pelos cientistas Von Euler e Liljestrand que documentaram aumentos da pressão da artéria pulmonar em gatos ventilados com misturas hipóxicas e mínima mudança na pressão de átrio esquerdo. Eles

concluíram que esse fenômeno “poderia aumentar o fluxo sanguíneo para segmentos aerados do pulmão, levando a uma melhor utilização do ar alveolar”.⁶⁸

HPV aumenta a resistência vascular pulmonar de 50 a 300%. A resposta vasoconstrictora à hipóxia se inicia em segundos, chegando a seu máximo em 15 minutos. Esse fenômeno não é potencializado por repetidos eventos hipóxicos e nem diminui quando a hipóxia é mantida por horas.⁶⁹ Em contrapartida, a resistência vascular pulmonar retorna ao normal imediatamente após o restabelecimento da normóxia.⁷⁰

O fenômeno da HPV depende da concentração de oxigênio nas vias aéreas e não do conteúdo venoso de O₂. Hambraeus-Jonzon et al demonstraram, através de ventilação unilateral com mistura hipóxica, queda importante da perfusão pulmonar global sem grandes mudanças na concentração venosa de oxigênio.⁷¹ Experimentos animais mostraram que a HPV não ocorre quando a concentração de oxigênio alveolar é normal e a concentração de oxigênio venosa é baixa, confirmando que a concentração alveolar de oxigênio é fator determinante desse fenômeno adaptativo.⁷²

A circulação pulmonar difere da circulação sistêmica em vários aspectos, sendo o mais importante o fato da circulação pulmonar contrair em resposta a estímulos hipóxicos (20 - 60 mmHg PaO₂), enquanto na circulação sistêmica esse estímulo causa relaxamento. A HPV é única dos vasos pulmonares, particularmente segmentos pequenos da artéria pulmonar.⁷³

Existe certa discrepância quando da instalação da HPV. Acredita-se que a constrição pulmonar se dê em duas etapas, a primeira nos primeiros 10 minutos (fase I) e a segunda, endotélio dependente, que se estabelece ao redor dos 40 minutos (fase II).⁷⁴ A fase I seria mediada através do influxo de cálcio para a célula muscular lisa e a fase II através da produção de endotelina.⁷⁵

O caminho comum final de todas as formas de vasoconstrição pulmonar envolve a ativação do aparelho contrátil (actina/miosina). Não existe suficiente evidência de que esse aparelho contrátil seja diferente nos vasos sistêmicos. Com exceção da hipóxia, a maioria dos agentes que causa constrição pulmonar tem o mesmo efeito na circulação sistêmica.

O que parece único aos pequenos vasos da circulação pulmonar é a localização das “unidades sensoras de oxigênio” dentro da célula muscular lisa. Quando existe uma queda na concentração de oxigênio intracelular, esses sensores localizados na cadeia proximal de transporte de elétrons na mitocôndria, respondem modulando a produção de mediadores tipo radicais livre de oxigênio, que entre outros efeitos são capazes de alterar a função de uma ou mais proteínas relacionadas ao controle de íons intracelulares (canais de K^+ / Ca^+).⁷⁶ Esse processo se dá através da redução/oxidação química (redox), onde a transferência de elétrons de e para grupos sulfidrilas alteram a função dessas proteínas.⁷⁷

A queda na concentração intracelular de oxigênio na célula muscular lisa dos vasos pulmonares, leva a produção de moléculas tipo superóxido e

possivelmente, diminuição na produção de ATP pelos canais tipo L de Ca^+ .⁷⁸ Outro efeito bastante conhecido da hipóxia é a o efeito antioxidativo (efeito redutor) sobre os canais de K^+ causando inibição e conseqüente despolarização da membrana plasmática.⁷⁹

Sendo assim, a hipóxia inibe o funcionamento dos canais de Hambraeus-Jonzon, que são importantes elementos responsáveis pela manutenção do potencial elétrico da membrana.⁸⁰ O fechamento desses canais, diminuem o efluxo de K^+ que normalmente ocorreria em função do gradiente extracelular, deixando o interior da célula relativamente mais positiva (despolarizada). Esse fenômeno possivelmente “abre” os canais tipo L de Ca^+ , permitindo o influxo de cálcio para dentro da célula vascular pulmonar lisa, levando a contração via ativação do aparato actina/miosina.⁸¹ O aumento na concentração intracelular de cálcio se inicia imediatamente após a instalação da hipóxia, alcançando seu máximo ao redor de 2 minutos, e se sustenta enquanto houver o estímulo hipóxico.⁸²

A elevação do cálcio intracelular age primariamente através da ativação da calmodulina - Ca^+ miosinoquinase de cadeia leve. O tônus vascular pulmonar é basicamente um balanço dinâmico entre a fosforilização e a defosforilização da miosinoquinase de cadeia leve e da miosinofosfatase de cadeia leve.⁸³

A Rho quinase é uma enzima importantíssima responsável pelo metabolismo do cálcio dentro da célula muscular lisa, agindo através da inibição

da miosino fosfatase de cadeia leve.⁸⁴ Existem evidências que a hipóxia é capaz de aumentar a atividade da Rho Quinase, porém a sua importância no controle da HPV ainda precisa ser adequadamente esclarecida.

Grande atenção tem sido dada ultimamente a fosfodiesterase na modulação da vasoconstrição pulmonar hipóxica. Isso se deve ao fato de que se postulou que a hipoxemia que se segue ao tratamento com inibidores da fosfodiesterase 5 em pacientes portadores de doença pulmonar, tem a ver com a reversão da HPV. Sabe-se que a exposição prolongada (24 horas) de células musculares lisas fetais à hiperóxia aumenta a atividade da FDE 5, razão pela qual pacientes portadores de hipertensão pulmonar tratados com oxigênio a 100% tem conteúdo pulmonar de cGMP diminuído e respondem inadequadamente a terapia exôgena com óxido nítrico.⁸⁵

A literatura ainda tem certa dificuldade em definir a importância da FDE 5 no fenômeno da vasoconstrição pulmonar hipóxica. Por um lado, evidências existem mostrando uma maior atividade em artérias pulmonares de ratos submetidos à hipóxia e por outro esse fenômeno não pode ser confirmado.^{86,87}

Nosso estudo tem como objetivo principal elucidar o efeito vasodilatador pulmonar específico do sildenafil endovenoso em um modelo de colapso pulmonar. Nossa hipótese principal é que o sildenafil usado de forma sistêmica nesse tipo de modelo, dilate preferencialmente áreas não adequadamente ventiladas, trazendo como resultado final, queda na pressão da artéria pulmonar, piora da relação ventilação perfusão e conseqüente piora da oxigenação.

2 JUSTIFICATIVA

A hipertensão pulmonar própria do recém nascido é uma síndrome complexa, de causa multi-fatorial, caracterizada por um aumento da pressão sistólica da artéria pulmonar (>35mmHg). Possui uma incidência de 0,4 – 6,8 / 1000 nascidos vivos e uma mortalidade que varia entre 10 a 20%. Pacientes que sobrevivem têm alta morbidade sob a forma de distúrbios do desenvolvimento neuro-psico-motor, perdas auditivas, seqüelas respiratórias e alta incidência de novas hospitalizações.

A melhor estratégia terapêutica continua controversa. Entretanto, o uso de soluções alcalinas associadas a drogas inotrópicas, sedativas e vasodilatadoras específicas, tem sido as terapias escolhidas pela maior parte dos neonatologistas.⁸⁸ Dados bibliográficos sugerem que aproximadamente 30% dos pacientes não respondem adequadamente ao óxido nítrico inalatório, sendo imperativo que as pesquisas continuem a buscar drogas com efeito vasodilatador pulmonar específico.⁸⁹

As estratégias farmacológicas para reverter a disfunção endotelial envolvida na HP do adulto são focadas no aumento da produção endógena do óxido nítrico através da suplementação com L-arginina, aumento da regulação da enzima óxido nítrico sintase com a administração de estrógeno e aumento da biodisponibilidade do NO através do uso de antioxidantes como a vitamina C.^{90,91,92} O uso de bloqueadores dos receptores da endotelina, aparecem como opção terapêutica, assim como a infusão de prostaciclina vasodilatadora.^{93,94}

A possibilidade de potencializar a regulação endotelial vascular através do prolongamento da resposta mediada pelo NO, através da inibição da quebra do cGMP, surge como uma nova opção terapêutica com o desenvolvimento de novas drogas inibidoras da fosfodiesterase 5.⁹⁵

Um número cada vez maior de publicações tem sugerido o uso dos inibidores da fosfodiesterase no tratamento à hipertensão pulmonar própria do recém nascido. O uso do sildenafil no tratamento da HP já vem sendo estudado há algum tempo, inclusive com experiências em humanos recém-nascidos, o que deflagrou extenso debate dentro da comunidade científica.⁹⁶

Os inibidores da FDE 5 são potencialmente mais seletivos que o restante dos vasodilatadores com base no fato de que a expressão da fosfodiesterase 5 é maior nos vasos pulmonares quando comparado à circulação sistêmica. A distribuição e a atividade da FDE 5 mostraram-se ser 50% menor na circulação mesentérica quando comparada a circulação pulmonar.⁹⁷

Entre os fenômenos químicos que acompanham a gênese da hipertensão pulmonar causada pela hipóxia está o aumento da expressão da enzima fosfodiesterase 5. Foi postulado que um aumento da atividade da fosfodiesterase esteja envolvida na fisiopatologia da hipertensão pulmonar induzida por hipóxia.⁹⁸ A fosfodiesterase é a enzima responsável pela hidrólise do cGMP no pulmão, limitando então o efeito vasodilatador e antiproliferativo celular dos fatores mediados pelo cGMP, como o peptídeo natriurético atrial e o fator natriurético cerebral.⁹⁹

Sendo assim, faz-se necessário elucidar o efeito do sildenafil endovenoso sobre as áreas do pulmão não adequadamente ventiladas, visto que o entendimento desse mecanismo é indispensável para o tratamento da hipertensão pulmonar associada às doenças do parênquima pulmonar.

Indispensável também que se determine a importância da fosfodiesterase 5 na regulação da HPV. A elucidação por completo de toda cadeia bioquímica que envolve o relaxamento vascular pulmonar e a total compreensão da interação dos inibidores da PDE 5 com a hipóxia pulmonar vasoconstrictora é de essencial importância no tratamento da hipertensão pulmonar própria do recém nascido.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Testar a hipótese que o sildenafil reverte o reflexo de proteção da vasoconstrição pulmonar hipóxica.

3.2 Objetivos Específicos

a) Testar a capacidade dos recém-nascidos suínos em desenvolver o reflexo de proteção da vasoconstrição pulmonar hipóxica .

b) Estudar o efeito do sildenafil sobre o fluxo sanguínea da aorta, das artérias pulmonares e dos ramos que perfundem diferentes áreas do pulmão,

comparando áreas ventiladas e áreas não ventiladas..

c) Estudar o efeito do sildenafil sobre a pressão parcial de oxigênio no modelo de colapso pulmonar antes e após o uso do sildenafil endovenoso.

d) Estudar o efeito do sildenafil sobre a pressão arterial sistêmica e a pressão da artéria pulmonar no modelo de colapso pulmonar

f) Analisar a concentração de cGMP no tecido pulmonar, comparando áreas ventiladas e não ventiladas.

4 REFERÊNCIAS

1. Kinsella J, Abman S. Recent developments in the pathophysiology and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Pediatr* 1995;126:853-64.
 2. Haworth SG. Pulmonary endothelium in the perinatal period. *Pharmacol Rep.* 2006;58:153-64
 3. Dakshinamurti S. Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Pulmonol* 2005;39:492-503.
 4. Wojciak-Stothard B, Haworth SG. Perinatal changes in pulmonary vascular endothelial function. *Pharmacol Ther* 2006;109:78-91.
 5. Sinha SK, Donn SM. Fetal-to-neonatal maladaptation. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006 ;11:166-73.
 6. Haworth SG. The pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Semin Neonatol* 1997;2:13-23.
-

7. Gagnon R Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110:99-107.
 8. Cornfield D, Resnik E, Herron J, Abman S. Chronic intrauterine pulmonary hypertension decreases calcium-sensitive potassium channel mRNA expression. *Am J Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:857-62.
 9. Asakura H. Fetal and neonatal thermoregulation. *J Nippon Med Sch* 2004;71:360-70.
 10. Galland BC, Peebles CM, Bolton DP, Taylor BJ. Oxygen consumption in the newborn piglet during combined cold face/hot body exposure. *J Paediatr Child Health* 1992;28:33-5.
 11. Evain-Brion D. Maternal endocrine adaptations to placental hormones in humans. *Acta Paediatr Suppl* 1999 ;88:12-6.
 12. Yuhanna I, MacRitchie A, Lantin-Hermoso R, Wells L, Shaul P. Nitric Oxide (NO) Upregulates NO Synthase Expression in Fetal Intrapulmonary Artery Endothelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:629-36.
 13. Thérèse P. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Paediatr Respir Rev* 2006;7:S175-6.
 14. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Griffin MF, Clark RH. Epidemiology of neonatal respiratory failure in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1154–60.
-

15. Skinner JR, Hunter S, Hey E. Haemodynamic features at presentation in persistent pulmonary hypertension of the newborn and outcome. Arch Dis Child Fetal and Neonatal Edition 1996;74:F26-32.
 16. Wiswell TE, Bent RC. Meconium staining and the meconium aspiration syndrome: unresolved issues. Pediatr Clin North Am 1993;40:955–81.
 17. Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK et al. Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: Practice variation and outcomes. Pediatrics 2000;105:14-20.
 18. Olschewski H, Olschewski A, Rose F, Schermuly R, Schutte H, Weissmann N. Physiologic basis for the treatment of pulmonary hypertension. J Lab Clin Med 2001;138:287-97.
 19. Weinberger B, Weiss K, Heck D, Laskin D, Laskin J et al. Pharmacology therapy of persistent pulmonary hypertension of the newborn. Pharmacology & Therapeutics 2001;89:67-79.
 20. Thébaud B, Saizou C, Farnoux C, Hartman J, Mercier J et al. Dypiridamole, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, transiently improves the response to inhaled nitric oxide in two newborns com congenital diaphragmatic hernia. Intensive Care Med 1999;25:300-3.
 21. Travadi JN, Patole SK et al. Phosphodiesterase inhibitors for persistent
-

- pulmonary hypertension of the newborn: A review. *Pediatr Pulmonol* 2003;36:529-35.
22. Roberts JD, Polaner DM, Lang P, Zapol WN. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 1992;340:818-9.
23. Endo A, Ayusama M, Mirato M, Takada M, Takahashi S, Harada K. Endogenous nitric oxide and endothelin -1 in persistent pulmonary hypertension of the newborn *Eur J Pediatr* 2001;160:217-22.
24. Sudhedar NV, Jauhari P, Natarajan R. Cost of inhaled nitric oxide therapy in neonates. *Lancet* 2002;359:1781-2.
25. Haddad IY, Ischiropoulos H, Holm BA, Beckman JS, Baker JR, Matalon M. Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol* 1993;265:555-64.
26. Makasi T. The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res* 1998;39:530-3.
27. Mercier J, Lacaze T, Sotrme L, Roze J, Dinh-Xuan A. Disease-related response to inhaled nitric oxide in newborns with severe hypoxaemic respiratory failure. French Paediatric Study Group of Inhaled NO. *Eur J Pediatr* 1998;157:747-52.
28. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J et al. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathway by nitric oxide in cardiac
-

myocytes. *Circ Res* 1999;84:1020-31.

29. Dukarm R, Russel J, Morin F, Perry B, Steinhorn R et al. The cGMP-specific phosphodiesterase inhibitor E4021 dilates the pulmonary circulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:858-65.
 30. Wallis R, Corbin J, Francis S, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 1999;83:3C-12
 31. Sebkini A, Strange J, Phillips S et al. Phosphodiesterase type 5 as a Target for the Treatment of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2003;107:3230-5.
 32. Steinhorn R, Morin F, Fineman J. Models of Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn (PPHN) and the role of Cyclic Guanosine Monophosphate (GMP) in Pulmonary Vasorelaxation. *Seminars in Perinatology* 1997;21:393-408
 33. Hanson KA, Ziegler JW, Rybalkin SD, Miller JW, Abman SH, Clarke W et al. Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *Am J Physiol* 1998;275:931-40
 34. Ohnishi M, Oka M, Muramatsu M, Sato K, Kira S, Fukuchi Y. E4021, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, potentiates the vasodilator effect of
-

- inhaled nitric oxide in isolated perfused rat lungs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999 ;33:619-24.
35. Steinhorn R, Gordon J, Tod M et al. Site-specific effect of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition in isolated lamb lungs. *Crit Care Med* 2000;28:490-5.
36. Dukarm R, Morin F, Russel J, Steinhorn R et al. Pulmonary and systemic effects of the phosphodiesterase inhibitor dipyridamole in newborns lambs with persistent pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 1998;44:831-37.
37. Berger J, Gibson R, Clarke W, Standaert T, Redding G, Henderson W et al. Effect of amrinone during group B streptococcus-induced pulmonary hypertension in piglets. *Pediatric Pulmonology* 1993;16:303-10.
38. Ichinose F, Adrie C, Hurford W, Bloch K, Zapol W et al. Selective pulmonary vasodilation induced by aerosolized zaprinast. *Anesthesiology* 1998;88:410-6.
39. Kleinsasser A, Loeckinger A, Hoermann C, Puehringer F, Mutz N, Bartsch G et al. Sildenafil modulates hemodynamics and pulmonary gas exchange. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:339-43.
40. Shekerdemian L, Ravn H, Penny D et al. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1098-102.
-

-
41. Benedict N, Seybert A, Mathier MA. Evidence-based pharmacologic management of pulmonary arterial hypertension. *Clin Ther* 2007;29:2134-53.
 42. Minotti GC, Corsonello A, Incalzi RA. Sildenafil in older patients with secondary pulmonary hypertension. *J Am Geriatr Soc* 2007;55:1681-2.
 43. Schulze-Neick I, Hartenstein P, Li J, Stiller B et al. Intravenous sildenafil is a Potent Pulmonary Vasodilator in Children With Congenital Heart Disease. *Circulation* 2003;108:167-73.
 44. West JB. Ventilation-perfusion inequality and overall gas exchange in computer models of the lung. *Respir Physiol* 1969;7:88-110.
 45. Dembinski R, Henzler D, Rossaint R. Modulating the pulmonary circulation: an update. *Minerva Anesthesiol* 2004;70:239-43.
 46. Shekerdemian L, Ravn H, Penny D et al. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1098-102.
 47. Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ. Interaction between inhaled nitric oxide and intravenous sildenafil in a porcine model of meconium aspiration syndrome. *Pediatr Res* 2004;55:413-8.
 48. Ryhammer PK, Shekerdemian LS, Penny DJ, Ravn HB. Effect of intravenous sildenafil on pulmonary hemodynamics and gas exchange in
-

the presence and absence of acute lung injury in piglets. *Pediatr Res* 2006;59:762-6.

49. Baquero H, Soliz A, Neira F, Venegas ME, Sola A. Oral sildenafil in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn: a pilot randomized blinded study. *Pediatrics* 2006;117:1077-83.

50. Vida VL, Gaitan G, Quezada E, Barnoya J, Castañeda AR. Low-dose oral sildenafil for patients with pulmonary hypertension: a cost-effective solution in countries with limited resources. *Cardiol Young* 2007;17:72-7.

51. Obaid L, Johnson S, Bigan D, Cheng P. Intraqueal administration of sildenafil and surfactant alleviates the pulmonary hypertension in newborn piglets. *Resuscitation* 2006;69:287-94.

52. Ichinose F, Erana-Garcia J, Hromi J, Raveh Y, Jones R, Krim L, Clark MW, Winkler JD, Bloch KD, Zapol WM. Nebulized sildenafil is a selective pulmonary vasodilator in lambs with acute pulmonary hypertension. *Crit Care Med* 2001;29:1000-5.

53. Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walrath D, Seeger W, Grimminger F. Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002;21:895-900.

-
54. Kleinsasser A, Loeckinger A, Hoermann C, Puehringer F, Mutz N, Bartsch G, Lindner KH. Sildenafil modulates hemodynamics and pulmonary gas exchange. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:339-43.
55. Ryhammer P, Pedersen M, Ringgaard S, Ravn H. Regional pulmonary perfusion using model-free analysis of contrast-enhanced MRI in meconium-aspirated piglets. *J Magn Reson Imaging* 2007;26:296-303.
56. Hopkins SR, Levin DL, Emami K, Kadlecsek S, Yu J, Ishii M, Rizi RR. Advances in magnetic resonance imaging of lung physiology. *J Appl Physiol* 2007;102:1244-54.
57. Nicolai T. The physiological basis of respiratory support. *Paediatr Respir Rev* 2006;7:97-102.
58. Hammer J. Acute lung injury: pathophysiology, assessment and current therapy. *Paediatr Respir Rev* 2001;2:10-21.
59. Hedenstierna G, Sandhagen B. Assessing dead space. A meaningful variable? *Minerva Anesthesiol* 2006;72:521-8.
60. Dueck R. Alveolar recruitment versus hyperinflation: A balancing act. *Curr Opin Anaesthesiol* 2006;19:650-4.
61. Elliott CG. Pulmonary physiology during pulmonary embolism. *Chest* 1992;101:163-71.
-

-
62. Mure M, Lindahl SG. Prone position improves gas exchange--but how? *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:150-9.
63. Acosta P, Santisbon E, Varon J. "The use of positive end-expiratory pressure in mechanical ventilation". *Crit Care Clin* 2007;23:251-61.
64. Michelakis E, Archer S. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *J Appl Physiol* 2005;98:390-403.
65. Brouns I, Pintelon I, Van Genechten J, De Proost I, Timmermans J, Adriaensen D. Vesicular glutamate transporter 2 is expressed in different nerve fibre populations that selectively contact pulmonary neuroepithelial bodies. *Histochem* 2004;121:1-12.
66. Thomas H, Garrett R. Strength of hypoxic vasoconstriction determines shunt fraction in dogs with atelectasis. *J Appl Physiol* 1982;53:44-51.
67. Bradford J, Dean H. The pulmonary circulation. *J Physiol* 1894;16:34-96.
68. Von Euler U, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 1946;12:301-20.
69. Bindslev L, Jolin A, Hedenstierna G, Bacherendtz S, Santesson J. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the human lung: effect of the repeated hypoxic challenges during anesthesia. *Anesthesiology* 1985;29:547-51.
70. Carlsson A, Bindslev L, Santesson J, Gottlieb I, Hedenstierna G. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the human lung: the effect of prolonged
-

unilateral hypoxic challenges during anesthesia. *Acta Anesthesiol Scand* 1985;29:346-51.

71. Hambraeus-Jonzon K, Bindslev L, Mellgard A, Hedestierna G. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the human lungs. A stimulus-response study. *Anesthesiology* 1997;86:308-15.

72. Orchard CH, Sanchez de Leon, Sykes MK. The relationship between hypoxic pulmonary vasoconstriction and arterial oxygen tension in the intact dog. *J Physiol* 1983;338:61-74.

73. Hampf V, Weir E, Archer S. Endothelium derived nitric oxide is less important for basal tone regulation in the pulmonary than the renal vessels of adult rat. *J Vac Med Biol* 1994;5:22-30.

74. Oparil S, Chen S, Meng Q, Elton T, Yano M, Chen Y. Endothelin-A receptor antagonist prevents acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in the rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1995;268:95-100.

75. Moudgil R, Michelakis E, Archer S. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 2005;98:390-403.

76. Michelakis E, Hampf V, Nsair A, Wu X, Harry G, Archer S. Diversity in the mitochondrial functions explains differences in vascular oxygen sensing. *Circ Res* 2002;90:1307-15.

77. Rounds S, McMurtry I. Inhibitors of oxidative ATP production cause

transient vasoconstriction and block subsequent pressor responses in the rat lung. *Circ Res* 1981;48:393-400.

78. Reeve H, Weir E, Nelson D, Peterson D, Archer S. Opposing effects of oxidants and antioxidants on K⁺ channels activity and tone in the rat vascular tissue. *Exp Physiol* 1995;80:825-34.

79. Hasunuma K, Rodman D, McMurtry I. Effects of K⁺ channel blockers on vascular tone in the perfused rat lung. *Am Ver Respir Dis* 1991;144:884-7.

80. Platoshyn O, Golovina V, Bailey C, Limsuwan A, Krick S, Yuan J. Sustained membrane depolarization and pulmonary smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:1540-9.

81. Robertson T, Hague D, Aaronson P, Ward J. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol* 2000;525:669-80.

82. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994;372:812.

83. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 2000;15:177-85.

84. Farrow KN, Groh BS, Schumacker PT, Lakshminrusimha S, Czech L, Gugino SF, Russell JA, Steinhorn RH. Hyperoxia Increases

Phosphodiesterase 5 Expression and Activity in Ovine Fetal Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 2008;102:226-33.

85. MacLean MR, Johnston ED, McCulloch KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G 1997 Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:619-24.

86. Kirsch M, Kemp-Harper B, Weissmann N, Grimminger F, Schmidt HH. Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling. *FASEB J* 2008;22:30-40.

87. Abman SH. Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neonatology* 2007;91:283-90.

88. Finan NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *Cochrane Database Syst Rev* 2006 18;(4):CD000399.

89. Clarkson P, Adms M, Powe A, Donald A et al. Oral L-Arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 1996;97:1989-94.

90. Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H et al. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS J* 1995;360:291-3.

-
91. Ting H, Timimi F, Haley H, Roddy M, Ganz P et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997;95:2617-22.
 92. Liu C, Chen J. Endothelin receptor antagonists for pulmonary arterial hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;(1):CD004434.
 93. Paramothayan NS, Lasserson TJ, Wells AU, Walters EH. Prostacyclin for pulmonary hypertension in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Apr 18;(2):CD002994.
 94. Hanson KA, Ziegler JW, Rybalkin SD, Miller JW, Abman SH, Clarke WR. Chronic pulmonary hypertension increases fetal lung cGMP phosphodiesterase activity. *Am J Physiol* 1998;275:L931-41.
 95. Patole S, Travadi J. Sildenafil for “Blue Babies”. Ethics, conscience and science have to be balance against limited resorces. *BMJ* 2002;325:1174.
 96. Itoh H, Pratt RE, Ohno M, Dzau VJ. Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension* 1992;19:758-61.
 97. Sanchez L, de la Monte S, Filippov G, Jones R, Zapol W, Bloch K. Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. *Pediatr Res* 1998;43:163-8.
-

98. Wallis R, Corbin J, Francis S, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol* 1999;83:3-12.
-

CAPÍTULO II

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Animais

Os estudos foram conduzidos no departamento de Biologia do Pulmão junto ao instituto de pesquisa do Hospital for Sickkids (University of Toronto - Canadá). Os experimentos animais foram realizados na própria instituição nos laboratórios de pesquisa animal, após aprovação do comitê de ética do Hospital São Lucas – PUCRS e do comitê de ética e pesquisa animal da University of Toronto.

Foram utilizados 20 porcos da raça Landrace entre 4 e 6 dias de vida com peso ao redor de 3 quilos. Os animais foram anestesiados inicialmente através de uma injeção intramuscular de ketamina (20mg/kg) e prometazina (0.5mg/Kg) e então colocados sob anestesia inalatória com isoflurano 2% através de uma máscara.¹ Após a inserção de um cateter Argyle 3,5 Fr na veia

femural, o isoflurano foi descontinuado e os animais receberam um *bolus* de 30mg/Kg de pentobarbital, seguido de uma infusão contínua de 0.2mg/Kg/min até o final do experimento.²

5.2 Ventilação Mecânica e Medidas Hemodinâmicas

Os animais eram mantidos aquecidos através de um colchão térmico, tendo sua temperatura e sinais vitais monitorados continuamente. Freqüência cardíaca, freqüência respiratória e saturação de oxigênio da hemoglobina foram registrados através de um monitor multiparâmetros (Novometrix Cosmo, Pittsburgh, PA, USA) e o CO₂ expirado através de um capnógrafo (Puritan Bennett, Pleasanton, Ca, USA).

Através de uma traqueotomia foi introduzido um tubo endotraqueal número 3 com *cuff*, posicionando sua ponta há 1 cm acima da carina. Os animais foram então conectados a um ventilador tipo Servo 300 (Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) programado para gerar um volume de 5ml/Kg e uma pressão de distensão no final da expiração (PEEP) de 5 cm de água. A freqüência do ventilador foi ajustada para manter o CO₂ expirado abaixo de 40 mmHg e o experimento todo conduzido com uma concentração de

oxigênio inspirado de 100%.³

A partir de uma incisão mediana no pescoço, tanto a veia jugular interna como a artéria carótida foram dissecadas e isoladas. Foi introduzida na artéria carótida um cateter umbilical Argyle 5 F para coleta de sangue e monitorização da pressão arterial sistêmica. A veia jugular interna foi também canulada e um cateter vascular Swan-Ganz 3,5 F (Omni Diagnost Eleva Philips Markham, On, CA) foi introduzido e posicionado no tronco da artéria pulmonar sob visualização direta da fluoroscopia. Tanto o cateter introduzido na artéria carótida como aquele posicionado na artéria pulmonar foram conectados a transdutores Hewlett-Packard 1280 (Hewlett-Packard, Waltham MA), sendo possível o registro contínuo da pressão arterial sistêmica, assim como da pressão da artéria pulmonar.⁴

A análise dos gases sanguíneos arteriais se deu antes e depois de qualquer das intervenções através de equipamento padrão de gasometria (Ultramat 6 , Siemens Medical Systems, Malvern, PA, USA).

5.3 Atelectasia do Lobo Inferior Direito

Através de um conector tipo “T” desenvolvido pelo próprio pesquisador e colocado entre o tubo traqueal e o circuito do ventilador, foi introduzido na via

aérea um cateter vascular com balão 3,5 F, do mesmo tipo utilizado em estudos hemodinâmicos (Stouffville, Ontario, Canada). Através de um equipamento de fluoroscopia (Omni Diagnost Eleva Philips, Markham, On, CA) a ponta do cateter era posicionada no brônquio que dá acesso ao lobo caudal direito imediatamente após a saída do brônquio fonte direito.⁵

O balão do cateter era então inflado com 0,3 ml de água, obstruindo totalmente o brônquio que ventila o lobo caudal direito. O gás que se encontrava então aprisionado no lobo caudal direito constando somente de oxigênio, rapidamente se difundia pela membrana alvéolo-capilar causando um colapso total dessa porção do pulmão. Esse procedimento foi testado previamente em um projeto piloto, onde se mostrou bastante confiável e seguro, sendo que o colapso do lobo caudal ocorria, em média, em menos de cinco minutos após a insuflação do balão.

5.4 Ressonância Magnética Nuclear

Os animais eram transferidos para o departamento de radiologia e posicionados sob um equipamento de ressonância magnética nuclear de 1,5 T equipado com gradientes de alta *performance* (GE Sigma Excite III, General

Electric HealthCare, Milwaukee, WI, USA)..

Os animais foram ventilados em posição supina graças a um ventilador compatível com estudos de ressonância magnética (LTV modelo 1200, Viasys, Health Care, Minneapolis, MN, USA), utilizando-se os mesmos parâmetros descritos anteriormente. Os sinais vitais eram continuamente registrados através de um monitor de parâmetros fisiológicos compatível com o equipamento de ressonância magnética nuclear e os dados armazenados no próprio equipamento (Ohmeda, Louisville, CO, USA).

Utilizando-se de técnicas de medidas de fluxo sanguíneo via ressonância magnética, foram analisados de forma quantitativa os fluxos na aorta, no tronco da artéria pulmonar, assim como nos seus ramos direito e esquerdo. O ramo caudal da artéria pulmonar, que perfunde o lobo caudal, também teve seu fluxo aferido tanto no pulmão direito quanto no esquerdo. Esse protocolo de mensurações de fluxo foi então repetido em vários momentos do estudo.

Para a localização correta dos vasos foram usados três conjuntos de imagens cobrindo o tórax em planos sagital, axial e coronal. Nesse momento foram usadas seqüências tipo *two dimensional non gated steady-state free procession images*. A localização do cateter inserido previamente na via aérea era nesse momento confirmada inflando-se o balão com água durante a aquisição das imagens.

Para medida de fluxos sanguíneos regionais foi utilizada a técnica *phase contrast MRI imaginig*.⁶ Os vasos descritos anteriormente e previamente localizados foram então alvo das mensurações em um plano perpendicular. O início da aquisição das imagens se dava juntamente com a despolarização ventricular (pico da onda R) resultando em 20 imagens para cada ciclo cardíaco.

Uma seqüência rápida de baixo ângulo era usada com os seguintes parâmetros: tempo de repetição de 17-34 ms, tempo de echo 4,8 ms, espessura do corte 5 mm, matrix 0.5 X 0.5 mm², campo de visão 12 x 12 cm, gradiente de velocidade 100cm/s. Esses parâmetros foram definidos anteriormente em estudos pilotos e se mostraram ideais para animais de pequeno porte.

5.5 Análise e Quantificação do Fluxo Sanguíneo

O fluxo sanguíneo foi calculado por um radiologista experiente de forma cega através das imagens *phase contrast* utilizando-se de um *software* comercialmente disponível (MATLAB – Mathworks, Natick, MA, USA). Inicialmente foram aplicadas as correções convencionais de *background-phase* para remover das imagens *background velocity errors*, permitindo que os dados

fossem adequadamente analisados.⁷

A região de interesse era então delimitada para identificar o lúmen de cada vaso estudado. A velocidade média sobre a região de interesse era multiplicada pela área do vaso para fins de cálculo de fluxo/volume.

Novas medidas de fluxo sanguíneo, seguindo o mesmo protocolo, foram realizadas 10 minutos após o estabelecimento do colapso do lobo caudal direito, colapso esse confirmado através de imagens da própria ressonância.

5.6 Administração do Sildenafil

O sildenafil foi fornecido diretamente por uma companhia farmacêutica (Pfizer, New York, New York, USA) e reconstituído em solução fisiológica na concentração de 2mg/ml para uso endovenoso. A dose utilizada foi de 0,2 (N=7) e 1mg/kg (N=7). Os animais do grupo controle (N=6) receberam igual volume de solução salina. As mensurações hemodinâmicas, de fluxo e gasométricas foram realizadas imediatamente antes e 30 minutos após a administração do sildenafil ou solução salina. A escolha das doses baseou-se em estudos animais em que doses semelhantes foram utilizadas.⁸

5.7 Conteúdo de cGMP no Parênquima Pulmonar

O conteúdo de cGMP do parênquima pulmonar foi usado como marcador indireto da atividade da fosfodiesterase 5 (FDE 5). Foram utilizados os animais do grupo controle, que não receberam sildenafil, no intuito de comparativamente estudar o efeito da hipóxia alveolar sobre a atividade da FDE.⁵

O conteúdo de cGMP do parênquima pulmonar foi medido no lobo caudal direito (atelectático/hipóxico) e no lobo caudal esquerdo (adequadamente ventilado/normóxico). Ainda com o coração batendo o tórax foi aberto e a circulação pulmonar perfundida com solução salina através do átrio direito. Após a retirada de todo o sangue da circulação pulmonar, os lobos caudais direito e esquerdo eram diretamente visualizados e o parênquima pulmonar dissecado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior análise bioquímica.

Foi usado para a análise do conteúdo de cGMP no parênquima pulmonar, um produto comercialmente disponível para uso em laboratório - Perkins-Elmer kit (AlphaScreen® cGMP assay, Montreal Quebec, Canada). Os resultados foram expressos em pico moles de cGMP por miligrama de proteína.⁹

Após o término do estudo, os animais foram sacrificados com uma

overdose de pentobarbital e, posteriormente dissecados para confirmação das posições dos cateteres vasculares e do dispositivo balão introduzido na via aérea. O colapso pulmonar também foi confirmado através da análise visual do lobo caudal direito, que apresentava características macroscópicas próprias.

5.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados através de análise de variância simples (One way ANOVA) obtida pelas comparações múltiplas através do teste de Tukey-Krammer. Significância estatística foi aceita com $p < 0.05$. Toda análise estatística foi feita através de um *softwarer* comercialmente disponível (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utha, USA). Os dados são apresentados como média e erro padrão.

6 REFERÊNCIAS

1. Frisk CS, Herman MD, Senta KE. Guinea Pig Anesthesia Using Various Combinations and Concentrations of Ketamine, Xylazine, and/or Acepromazine. *Lab. Anim. Sci* 1982;32:434.
 2. Jenkins WL. Pharmacologic aspects of analgesic drugs in animals: An overvie. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191:1231-40.
 3. Markstrom, A Lichtwarck-Aschoff, M, Svensson B, Nordgren K, Ulf H. Ventilation with Constant Versus Decelerating Inspiratory Flow in Experimentally Induced Acute Respiratory Failure. *Anesthesiology* 1996;84:882-9.
 4. Van der Hoeven MA, Maertzdorf WJ, Blanco CE. Relationship between mixed venous oxygen saturation and markers of tissue oxygenation in progressive hypoxic hypoxia and in isovolemic anemic hypoxia in 8-to 12-day-old piglets. *Crit Care Med* 1999;27:1885-92.
-

-
5. Dondelinger RF, Ghysels MP, Brisbois D, Donkers E, Snaps FR, Saunders J, Devière J. Relevant radiological anatomy of the pig as a training model in interventional radiology. *Eur Radiol* 1998;8:1254-73.
 6. Pai VM. Phase contrast using multiecho steady-state free precession. *Magn Reson Med* 2007;58:419-24.
 7. Chernobelsky A, Shubayev O, Comeau CR, Wolff SD. Baseline correction of phase contrast images improves quantification of blood flow in the great vessels. *J Cardiovasc Magn Reson* 2007;9:681-5.
 8. Ryhammer PK, Shekerdemian LS, Penny DJ, Ravn HB. Effect of intravenous sildenafil on pulmonary hemodynamics and gas exchange in the presence and absence of acute lung injury in piglets. *Pediatr Res* 2006;59:762-6.
 9. Gesellchen F, Prinz A, Zimmermann B, Herberg FW. Quantification of cAMP antagonist action in vitro and in living cells. *Eur J Cell Biol* 2006;85:663-72.
-

CAPÍTULO III

ARTIGO ORIGINAL

“Sildenafil Acutely Reverses the Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction Response of the Newborn Pig”

ABSTRACT

Sildenafil is a vasodilator used in the treatment of persistent pulmonary hypertension of the neonate (PPHN) syndrome, but conflicting data exist regarding its effect on arterial oxygenation. We tested its effect on the piglet's hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) response. A segmental lung atelectasis was created by obstructing the corresponding bronchus. Total pulmonary and specific flows to the atelectatic and contra-lateral lobes were measured by magnetic resonance (MR) before and 30 min post sildenafil (0.2 and 1mg/kg iv) or saline administration. Flow was reduced ($P<0.01$) in the atelectatic and increased in the contra-lateral lobe indicating an effective HPV response. Sildenafil at both doses significantly ($P<0.01$) increased flow solely to the atelectatic lobe. At a dose of 1 mg/kg sildenafil induced a decrease in PaO₂ from 285 ± 37 to 161 ± 22 mmHg ($P<0.01$). We conclude that the HPV response in the newborn is capable of almost completely reducing blood flow to nonventilated lung units and is reversed following sildenafil iv administration in a dose-dependent manner. In the presence of lung parenchymal disease, the use of iv sildenafil in the treatment of PPHN syndrome may worsen arterial oxygenation by reversing the HPV response in non-ventilated lung units.

INTRODUCTION

Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) syndrome is a rather common and life threatening disorder requiring intensive care, supplemental oxygen and mechanical ventilation (1). The use of inhaled nitric oxide (NO) as a selective pulmonary vasodilator significantly reduced neonatal morbidity and mortality associated with this syndrome (2). Given the cost and need for a dedicated apparatus to administered inhaled NO there has been a recent interest in alternative pharmacological approaches to achieve pulmonary vasodilation in infants with PPHN syndrome.

Among the clinically approved and commercially available compounds, sildenafil, a phosphodiesterase 5 (PDE-5) inhibitor, is one of the most comprehensively studied drugs and found beneficial in the pulmonary hypertension treatment of adult and pediatric subjects (3). Except for the penile vasculature, PDE-5 expression is highest in the lung and even when parenterally administered, sildenafil has a pulmonary preferential vasodilatory effect (4).

The use of sildenafil for the treatment of the PPHN syndrome generated considerable debate in the literature. On one hand innumerous clinical studies documented a significant improvement in arterial oxygenation (1, 3, 5-8). Yet lung parenchymal disease (e.g. meconium aspiration syndrome) is commonly associated with the PPHN syndrome (9) and worsening of arterial oxygenation has been reported in animal models of this disease (10-12). As such, it has been

suggested that sildenafil inhibits the hypoxic pulmonary vasoconstrictor (HPV) response leading to increased blood flow to non-ventilated lung units (10). This speculative mechanism has never been properly evaluated

Little is known about the HPV response in the newborn. As compared with the adult animal data the HPV response is reduced early in life in sheep and rabbits (13-15), but following repeated stimulation its magnitude is increased in the newborn pig (16).

Thus, the issue at stake is whether parenteral sildenafil administration at doses low enough to treat pulmonary hypertension reverses the HPV response in the newborn. A single recent study attempted to evaluate the iv sildenafil effect on the regional pulmonary blood flow of the meconium-induced PPHN syndrome piglet model (17). In that study sildenafil at a dose of 0.2 mg/kg iv reduced meconium-induced pulmonary hypertension without significantly altering arterial oxygenation. Yet the interpretation of the sildenafil effect on regional blood flow to well and poorly ventilated areas was made technically impossible to evaluate given the widespread parenchymal disease associated with meconium aspiration.

The purpose of the present study was to comparatively evaluate blood flow changes to ventilated and non-ventilated lung units in a newborn animal model of acute lobar atelectasis by flow-sensitive magnetic resonance (MR) imaging methods. We hypothesized that in the newborn, iv sildenafil, even in low doses, reverses the HPV response of non-ventilated (atelectatic) lung units.

METHODS AND MATERIALS

Animals:

Twenty newborn pigs (4-6 days old) were studied. General anesthesia was induced with ketamine (20mg/Kg, im) and akemizine (0.5mg/Kg, im) and initially maintained with 2% isoflurane and subsequent to the placement of a femoral vein catheter with iv pentobarbital (30mg/kg induction followed by continuous infusion of 0.2mg/kg/min).

The animals were maintained warm with the use of a heating blanket and the body temperature together with heart rate, respiratory rate, oxygen saturation (pulse oximetry, Novamatrix Cosmo, Pittsburgh, PA, USA) and end-tidal CO₂ (Puritan Bennett, Pleasanton, CA, USA) continuously measured. At the end of the study the animals were sacrificed with an overdose of pentobarbital and the lung tissue frozen for cGMP content measurement. All procedures were conducted according to criteria established by the Canadian Council on Animal Care and were approved by The Hospital for Sick Children Research Institute Animal Care Review Committee.

Mechanical Ventilation and Hemodynamic Measurements

An incision was made in the neck and both internal jugular vein and carotid artery were dissected. A 5 F Argyle umbilical catheter was introduced in the carotid artery and advanced into the aorta and a 3.5 F Swan-Ganz catheter

into the jugular vein and guided into the pulmonary artery by fluoroscopy (OmniDiagnost Eleva Philips, USA). Both catheters were connected to Hewlett-Packard 1280 transducers for continuous measurement of systemic and pulmonary arterial pressures (Hewlett-Packard, Waltham, MA, USA).

A tracheostomy was performed and a cuffed tracheal tube inserted for mechanical ventilation (Servo 300 - Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany). The animals were ventilated on pure oxygen at a tidal volume of 5 ml/kg, positive end expiratory pressure (PEEP) = 5 cm H₂O. The ventilatory rates were adjusted to maintain an end-tidal PCO₂ = 40 mmHg.

Right lobar atelectasis

In order to induce right lower lobe atelectasis, a 3.5 F vascular balloon catheter (Stouffville, Ontario, Canada) was advanced through the endotracheal tube and fluoroscopy-guided to place its tip immediately above the entrance to the right lower lobe bronchus. MR measurements were obtained before and after bronchus occlusion (inflation of the vascular balloon catheter). In preliminary experiments we determined that right lower lobe atelectasis was consistently obtained in less than 5 min post bronchial occlusion (Figure 1).

Sildenafil administration

The sildenafil powder (generously supplied by Pfizer, New York, New York, USA) was reconstituted in normal saline (2 mg/ml) and administered iv over 10 min at a dose of 0.2 (N=7) or 1 mg/kg (N=7). Control animals (N=6) received a similar volume of saline solution. Measurements were obtained pre and 30 min post sildenafil, or saline administration.

cGMP tissue content

cGMP lung tissue content was measured as a surrogate marker for PDE-5 activity in the atelectatic and contralateral lobes of control animals (N=3) to comparatively evaluate the effect of alveolar hypoxia (30 min). The Perkin-Elmer kit (AlphaScreen® cGMP assay, Montreal Quebec, Canada) was utilized for this purpose, following manufacturer instructions.

Magnetic Resonance Imaging

Studies were performed on a 1.5 Tesla MR scanner (GE Signa EXCITE III; General Electric Healthcare, Milwaukee, WI, USA) equipped with high-performance gradients (slew rate of 150 mT/m/ms; amplitude of 40 mT/m) and an eight-channel birdcage receiver coil.

The anesthetized animals were imaged supine and were mechanically ventilated using an MR-compatible ventilator (LTV model 1200, Viasys Health

Care, Minneapolis, MN, USA). Electrocardiographic leads were attached to the chest to provide a gating signal for the MR data acquisition.

For localization, three sets of images covering the chest in the coronal, axial, and sagittal planes were acquired at the beginning of the examination using a two-dimensional non-gated steady-state free precession imaging sequence. Visualization of the previously-inserted balloon was possible by momentarily inflating the balloon with saline during the acquisition of these images.

Regional pulmonary blood flow was then measured using a velocity-sensitive MR technique known as phase-contrast (PC) MR imaging (18) and proven to have an accuracy of within 3% of the actual measurement (19). The vessel feeding the lower right segment was targeted first by prescribing an imaging plane perpendicular to the vessel at the level of the balloon. The contralateral vessel was then targeted and the scan repeated. These cardiac-gated scans resulted in 20 cross-sectional images of each peripheral artery throughout the cardiac cycle, with pixel intensities equal to the blood-flow velocity through the imaging plane (Figure 2). Velocity scans of both vessels were repeated after induction of segmental atelectasis and again after administration of sildenafil, and the resulting change in volume flow calculated.

Specific imaging parameters for this sequence were: field-of-view = 12×12 cm, in-plane spatial resolution $\approx 0.5 \times 0.5$ mm², slice thickness = 5 mm, aliasing velocity = ± 100 cm/s, effective temporal resolution = 17–34 ms, and number of signal averages = 3.

Flow Analysis

Quantitative analysis of the PC MR data was performed using commercial software with customized routines (MATLAB – Mathworks, Natick, MA, USA). First, conventional background-phase correction was applied to the data to remove background velocity errors from the images (20). A region of interest (ROI) was then drawn to identify the lumen of each targeted pulmonary artery in the PC MR data. The average velocity over the ROI was multiplied by the area of the ROI to calculate the flow volume in each image. Summation of these volumes over all 20 images produced the volume flow per cardiac cycle. From these values, percentage changes in flow relative to baseline (i.e., before atelectasis) were calculated at each stage of the experiment.

Data Analysis

Data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with multiple comparisons obtained by the Tukey-Kramer test when appropriate. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$. All statistical analysis was performed with the Number Cruncher Statistical System (NCSS, Kaysville, Utah, USA). Results are presented as mean \pm SEM.

Results

Hemodynamic and oxygenation changes induced by right lobar atelectasis

Right lower lobe atelectasis resulted in a significant increase in mean pulmonary arterial pressure ($P<0.01$) and decrease in PaO_2 ($P<0.01$) without altering cardiac output or systemic blood pressure (Table 1). Regional blood flow to the atelectatic lung lobe was significantly ($P<0.01$) reduced by 64%, whereas the flow to the contralateral lung region tended to increase, but the change was not statistically significant ($P=0.25$; Table 1).

Sildenafil effect

Sildenafil infusion resulted in a significant ($P<0.01$) decrease in pulmonary and systemic arterial pressures (Figure 3). At a dose of 0.2 mg/kg, sildenafil reduced the pulmonary arterial pressure to a level comparable to the pre-atelectasis measurement. A further non-statistically significant reduction in pulmonary arterial pressure was observed in the animals treated with 1 mg/kg.

Figure 4 illustrates the total and regional changes in pulmonary blood flow in the control and sildenafil-treated animals. Administration of 1 mg/kg sildenafil significantly increased the regional blood flow to the right lower atelectatic lobe ($P<0.01$) without statistically altering the flow in the contralateral lower lobe (Figure 4). The regional flows shown in Figure 4 represent only that fraction of

the cardiac output reaching the lower segments of the left and right lungs, and as such are not equal to the total flow.

Sildenafil did not significantly alter either the total pulmonary blood flow (cardiac output), or pulmonary or systemic vascular resistance (Figure 5). As compared with the control group, arterial oxygenation progressively decreased following sildenafil administration and was significantly lower ($P < 0.01$) at the 1 mg/kg dose (Figure 6).

The cGMP content of the atelectatic right lobe was 115 ± 12 pmol/mg tissue protein and not significantly different when compared with the left contralateral lobe (127 ± 15 pmol/mg tissue protein). These tissue cGMP content data suggest that atelectasis does not acutely increase PDE-5 activity in the piglet lung.

Discussion

Ventilating anesthetized adult cats with a hypoxic gas mixture, Euler and Liljestrand were the first to report the association between alveolar hypoxia and increased pulmonary vascular resistance (21). This physiological response minimizes ventilation-perfusion mismatch, by reducing blood flow to poorly ventilated areas, thus optimizing blood oxygenation. In the newborn the HPV response has been documented to exist, but it remains unknown how this response varies with age in humans. In sheep (14, 22) and rabbit (15) the

magnitude of response was reported to be lowest in the newborn and increase with age.

Lung parenchymal disease is a common finding in infants with the PPHN syndrome and meconium aspiration is the most common associated pathology and present in as many as 41% of the patients in one study (9). If intact, the HPV response would limit blood flow to lung units filled with meconium thus maximizing ventilation-perfusion mismatch. The goal of this study was to evaluate whether sildenafil iv administration reverses the HPV response in the newborn.

We developed a newborn animal model of unilateral lobar atelectasis and utilized phase contrast MR imaging to simultaneously measure regional blood flow to the atelectatic and contralateral lung units. We purposefully did not attempt to utilize pulmonary vasoconstrictor agonists (i.e. thromboxane A₂ analogue) to further increase the pulmonary arterial pressure. This was done to study the sildenafil effect on the atelectasis-induced physiologically-mediated HPV response, in the absence of other confounding pharmacological agonist effects on the pulmonary circulation.

In the present study we documented reversal of the HPV response with sildenafil in a dose dependent manner, resulting in increased ventilation-perfusion mismatch and reduced arterial oxygenation in piglets. These data are in-keeping with previous reports of iv sildenafil use in a piglet model of meconium-induced PPHN syndrome, where worsening oxygenation was also observed (10-12). In contrast with these previous studies, ours is the first to

evaluate the effect of the drug on the HPV response of a non-injured lung.

In adult humans and animals, sildenafil administered either orally or intravenously suppresses the HPV response (23, 24). In adult dogs, sildenafil partially reversed pulmonary vasoconstriction induced by inhaled hypoxic gas, but less so than inhaled NO (24). Yet a significant decrease in oxygenation and increase in V/Q mismatch was reported following iv administration of prostacyclin, but were not observed following oral administration of sildenafil to human subjects with chronic parenchymal lung disease (25).

Sildenafil has been advocated for the treatment of infants with the PPHN syndrome based on favorable anecdotal and small scale clinical studies (1). Oral (5, 26), intratracheal or intravenous (27) therapeutic use of sildenafil has been reported to result in improvement in the arterial oxygenation of children with pulmonary hypertension. Sildenafil, however is not a selective pulmonary vasodilator and its intravenous administration has been shown to cause systemic hypotension in animals and humans (24, 28, 29).

A recently published Cochrane review of sildenafil use for the PPHN treatment reported a favorable clinical response, reduction of mortality and absence of significant side effects, but did not recommend as standard therapy in this syndrome (30). Yet there are reports of worsening oxygenation following sildenafil administration to infants for the treatment of surgically-induced pulmonary hypertension (31-33).

The possible explanation for the apparent discrepancy in the sildenafil effect on oxygenation amongst the different studies lies in the acute nature of

the animal experimental models and the chronic characteristics of lung parenchymal disease. Exposure to hypoxia for at least three hours selectively suppresses the HPV response and animals living at high altitude exhibit a weak or absent response (34). The HPV response has also been shown to markedly decrease after five days in adult rabbits exposed to chronic hypoxia (35), possibly secondary to an increase in NO production that abrogates the HPV response (36).

We speculate that in infants with PPHN syndrome and associated lung disease the HPV response wanes over time contributing to the worsening gas exchange. Under these conditions of a time-suppressed HPV response, the sildenafil pulmonary vasodilatory effect will enhance blood perfusion to ventilated segments without altering it to the non-ventilated lung units. As such the end result will be improved oxygenation. A similar phenomenon may be present in adults with chronic parenchymal lung disease accounting for the therapeutically beneficial effect of sildenafil (25). Further experimental testing of sildenafil in chronic animal models of lung parenchymal disease is necessary to test this hypothesis.

Lastly hypoxia has been shown to up-regulate PDE-5 activity in some (37), but not other chronic animal models (38). In vitro experiments on the magnitude of NO generation under hypoxic conditions support this speculation. Grimminger F et al showed that in rabbit lungs examined ex vivo, exhaled NO was significantly reduced following hypoxia (39), possibly as a result of an O₂-dependent reduction in airway epithelial NO production (40). The NO-mediated

vasorelaxation was also found to be reduced in the perfused rabbit lungs (41), lending further support to the speculation that chronic hypoxia upregulates PDE-5 activity.

In the present study we evaluated the effect of acute hypoxia (reduced alveolar ventilation) on the PDE-5 activity. We utilized the lung cGMP level as a surrogate marker for PDE-5 activity. No significant differences in cGMP levels were observed in the atelectatic, as compared with the contralateral lobe 30 min following balloon inflation. In rats, pentobarbital anesthesia and mechanical ventilation acutely increase the lung tissue cGMP content (42), possibly as a result of decreased PDE-5 activity. Thus it is possible that a similar effect on the piglet preparation utilized in this study masked any alveolar hypoxia (atelectasis)-induced PDE-5 activity increase.

Anesthetics can also alter the HPV response and isoflurane is known to significantly reduce its magnitude (43). A similar HPV response lowering effect was observed with pentobarbital in the ex vivo sheep lung (44). In the present study the atelectatic and non-atelectatic lung units were comparatively evaluated in each animal. As such any anesthesia effect on the measurements would be similar for both lung regions.

In summary we demonstrated that the newborn pig can mount a significant and effective acute HPV response that is acutely reversed by iv sildenafil in a dose-dependent manner. The present results are in-keeping with other data showing a reduction in arterial oxygenation following sildenafil treatment. Although not a model of PPHN syndrome, the newborn piglet data

obtained in this study raise concern regarding the therapeutic use of sildenafil in this condition when associated with lung parenchymal disease.

Reference List

1. Abman SH 2007 Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neonatology* 91:283-290
 2. Cook LN, Stewart DL 2005 Inhaled nitric oxide in the treatment of persistent pulmonary hypertension/ hypoxic respiratory failure in neonates: an update. *J Ky Med Assoc* 103:138-147
 3. Juliana AE, Abbad FC 2005 Severe persistent pulmonary hypertension of the newborn in a setting where limited resources exclude the use of inhaled nitric oxide: successful treatment with sildenafil. *Eur J Pediatr* 164:626-629
 4. Hemnes AR, Champion HC 2006 Sildenafil, a PDE5 inhibitor, in the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4:293-300
 5. Baquero H, Soliz A, Neira F, Venegas ME, Sola A 2006 Oral sildenafil in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn: a pilot randomized blinded study. *Pediatrics* 117:1077-1083
 6. Martell M, Blasina F, Silvera F, Tellechea S, Godoy C, Vaamonde L,
-

-
- Benenatti L, Olivera W 2007 Intratracheal sildenafil in the newborn with pulmonary hypertension. *Pediatrics* 119:215-216
7. Obaid L, Johnson ST, Bigam DL, Cheung PY 2006 Intratracheal administration of sildenafil and surfactant alleviates the pulmonary hypertension in newborn piglets. *Resuscitation* 69:287-294
8. Simiyu DE, Okello C, Nyakundi EG, Tawakal AH 2006 Sildenafil in management of persistent pulmonary hypertension of the newborn: report of two cases. *East Afr Med J* 83:337-340
9. Walsh-Sukys MC, Tyson JE, Wright LL, Bauer CR, Korones SB, Stevenson DK, Verter J, Stoll BJ, Lemons JA, Papile LA, Shankaran S, Donovan EF, Oh W, Ehrenkranz RA, Fanaroff AA 2000 Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes. *Pediatrics* 105:14-20
10. Ryhammer PK, Shekerdemian LS, Penny DJ, Ravn HB 2006 Effect of intravenous sildenafil on pulmonary hemodynamics and gas exchange in the presence and absence of acute lung injury in piglets. *Pediatr Res* 59:762-766
11. Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ 2004 Interaction between inhaled nitric oxide and intravenous sildenafil in a porcine model of meconium aspiration syndrome. *Pediatr Res* 55:413-418
-

12. Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ 2002 Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1098-1102
 13. de Cleyt SC, Decell MK, Tod ML, Sirois P, Gordon JB 1998 Developmental changes in synthesis of and responsiveness to prostaglandins I₂ and E₂ in hypoxic lamb lungs. *Can J Physiol Pharmacol* 76:764-771
 14. Gordon JB, Tod ML, Wetzel RC, McGeady ML, Adkinson NF, Jr., Sylvester JT 1988 Age-dependent effects of indomethacin on hypoxic vasoconstriction in neonatal lamb lungs. *Pediatr Res* 23:580-584
 15. Fike CD, Hansen TN 1987 Hypoxic vasoconstriction increases with postnatal age in lungs from newborn rabbits. *Circ Res* 60:297-303
 16. Belik J, Sienko A, Light RB 1990 The effect of repeated intermittent hypoxia on pulmonary vasoconstriction in the newborn. *Can J Physiol Pharmacol* 68:355-362
 17. Ryhammer P, Pedersen M, Ringgaard S, Ravn H 2007 Regional pulmonary perfusion using model-free analysis of contrast-enhanced MRI in meconium-aspirated piglets. *J Magn Reson Imaging* 26:296-303
 18. Lotz J, Meier C, Leppert A, Galanski M 2002 Cardiovascular flow measurement with phase-contrast MR imaging: basic facts and implementation. *Radiographics* 22:651-671
-

19. Lankhaar JW, Hofman MB, Marcus JT, Zwanenburg JJ, Faes TJ, Vonk-Noordegraaf A 2005 Correction of phase offset errors in main pulmonary artery flow quantification. *J Magn Reson Imaging* 22:73-79
 20. Walker PG, Cranney GB, Scheidegger MB, Waseleski G, Pohost GM, Yoganathan AP 1993 Semiautomated method for noise reduction and background phase error correction in MR phase velocity data. *J Magn Reson Imaging* 3:521-530
 21. Liljestrand G 1958 Chemical control of the distribution of the pulmonary blood flow. *Acta Physiol Scand* 44:216-240
 22. Gordon JB, Hortop J, Hakim TS 1989 Developmental effects of hypoxia and indomethacin on distribution of vascular resistances in lamb lungs. *Pediatr Res* 26:325-329
 23. Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A, Wilkins MR 2001 Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 104:424-428
 24. Fesler P, Pagnamenta A, Rondelet B, Kerbaul F, Naeije R 2006 Effects of sildenafil on hypoxic pulmonary vascular function in dogs. *J Appl Physiol* 101:1085-1090
 25. Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F 2002
-

- Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 360:895-900
26. Abrams D, Schulze-Neick I, Magee AG 2000 Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. *Heart* 84:E4
 27. Nagdyman N, Fleck T, Bitterling B, Ewert P, Abdul-Khaliq H, Stiller B, Hubler M, Lange PE, Berger F, Schulze-Neick I 2006 Influence of intravenous sildenafil on cerebral oxygenation measured by near-infrared spectroscopy in infants after cardiac surgery. *Pediatr Res* 59:462-465
 28. Nieminen T, Koobi T, Tammela TL, Kahonen M 2006 Hypotensive potential of sildenafil and tamsulosin during orthostasis. *Clin Drug Investig* 26:667-671
 29. Jackson G, Montorsi P, Cheitlin MD 2006 Cardiovascular safety of sildenafil citrate (Viagra): an updated perspective. *Urology* 68:47-60
 30. Shah P, Ohlsson A 2007 Sildenafil for pulmonary hypertension in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* CD005494
 31. Schulze-Neick I, Hartenstein P, Li J, Stiller B, Nagdyman N, Hubler M, Butrous G, Petros A, Lange P, Redington AN 2003 Intravenous sildenafil is a potent pulmonary vasodilator in children with congenital heart disease. *Circulation* 108 Suppl 1:II167-II173
-

-
32. Schulze-Neick I, Redington AN 2004 Sildenafil, nitric oxide, and acute lung injury: pathophysiology beats pharmacotherapy? *Pediatr Res* 55:370-371
 33. Stocker C, Penny DJ, Brizard CP, Cochrane AD, Soto R, Shekerdemian LS 2003 Intravenous sildenafil and inhaled nitric oxide: a randomised trial in infants after cardiac surgery. *Intensive Care Med* 29:1996-2003
 34. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL 2005 Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* 98:390-403
 35. Weissmann N, Nollen M, Gerigk B, Ardeschir GH, Schermuly RT, Gunther A, Quanz K, Fink L, Hanze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F 2003 Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H931-H938
 36. Archer SL, Tolins JP, Raj L, Weir EK 1989 Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 164:1198-1205
 37. MacLean MR, Johnston ED, McCulloch KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G 1997 Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 283:619-624
 38. Kirsch M, Kemp-Harper B, Weissmann N, Grimminger F, Schmidt HH 2007
-

Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling. *FASEB J*

39. Grimminger F, Spriestersbach R, Weissmann N, Walmrath D, Seeger W 1995 Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 78:1509-1515
 40. Ide H, Nakano H, Ogasa T, Osanai S, Kikuchi K, Iwamoto J 1999 Regulation of pulmonary circulation by alveolar oxygen tension via airway nitric oxide. *J Appl Physiol* 87:1629-1636
 41. Weissmann N, Winterhalder S, Nollen M, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F 2001 NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L638-L645
 42. Klass DJ 1978 Lung tissue guanosine 3',5'-monophosphate: effects of ventilation and anesthesia. *J Appl Physiol* 45:487-494
 43. Mathers J, Benumof JL, Wahrenbrock EA 1977 General anesthetics and regional hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Anesthesiology* 46:111-114
 44. Wetzel RC, Martin LD 1989 Pentobarbital attenuates pulmonary vasoconstriction in isolated sheep lungs. *Am J Physiol* 257:H898-H903
-

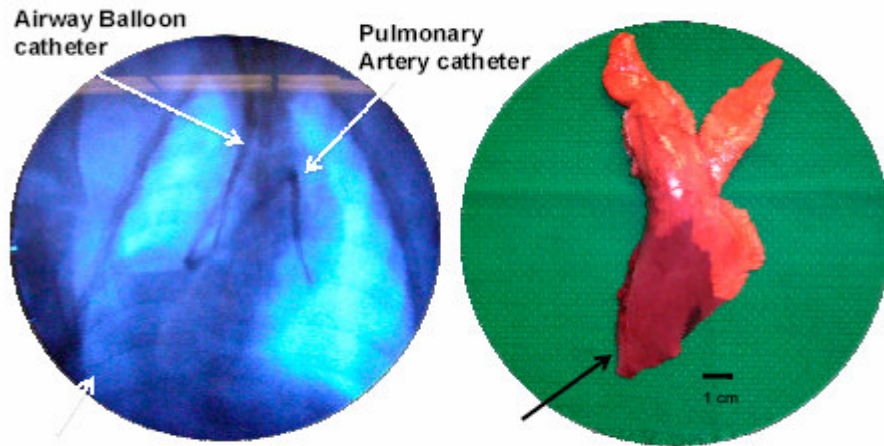
TABLE

Table 1. Hemodynamic, pH and arterial oxygenation changes following right lower lobe atelectasis

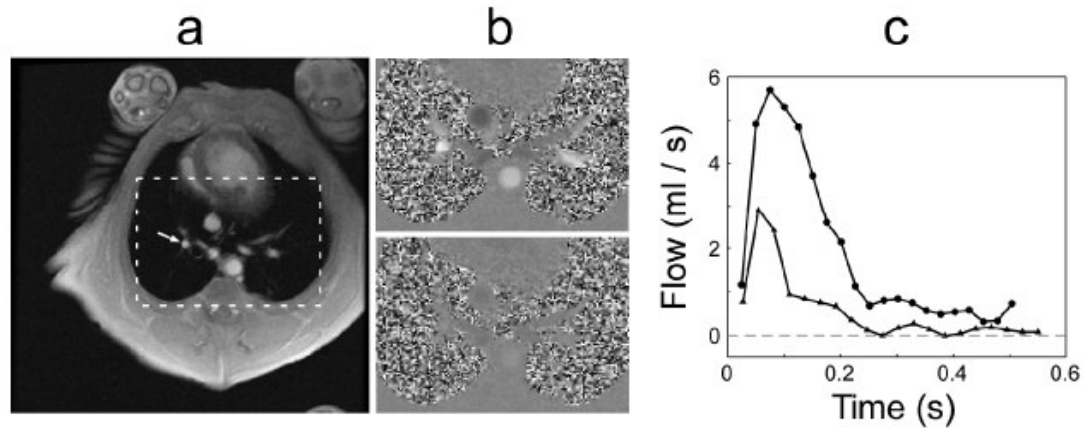
Lobar	P _{sa}	P _{pa}	CO	Q _{atelectatic}	Q _{contralateral}	PVR	SVR	pH	PaO ₂
Atelectasis									
Pre	77±2	19±1	163±16	58±9	52±12	0.15±0.02	0.47±0.04	7.40±0.01	368±20
Post	76±1	24±1**	147±11	21±4**	77±9	0.24±0.002**	0.58±0.05	7.39±0.01	273±18**

P_{SA}: Mean Systemic arterial Pressure (mmHg); **P_{pa}**: Mean Pulmonary Arterial Pressure (mmHg)
CO: Cardiac Output (ml.kg/min) **Q_{atelectatic}**: Regional blood flow to the Right lower atelectatic lobe region of interest (ml.kg/min). **Q_{contralateral}**: Regional blood flow to the contralateral lobe region of interest (ml.kg/min): **PVR**: Pulmonary Vascular Resistance (mmHg.ml⁻¹.min.kg) **SVR**: Systemic Vascular Resistance (mmHg.ml⁻¹.min.kg). **PaO₂**=Partial pressure of oxygen in arterial blood (mmHg). **pH**: arterial blood pH. Data are Mean ± SE. N= 6. ** P<0.01 as compared with Pre levels by Student t-test.

FIGURES

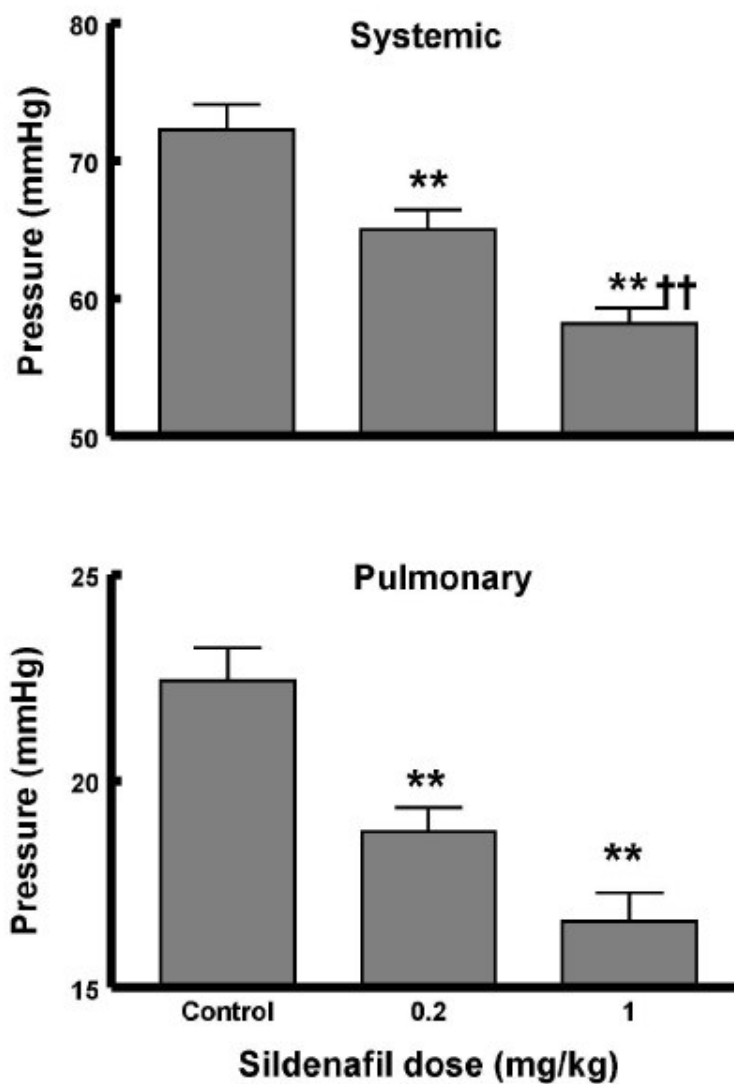


1. Newborn pig chest fluoroscopy illustrating the placement of the bronchus occluder catheter in the right lung (left panel) and the resulting right lower lobe atelectasis on postmortem assessment (right panel).

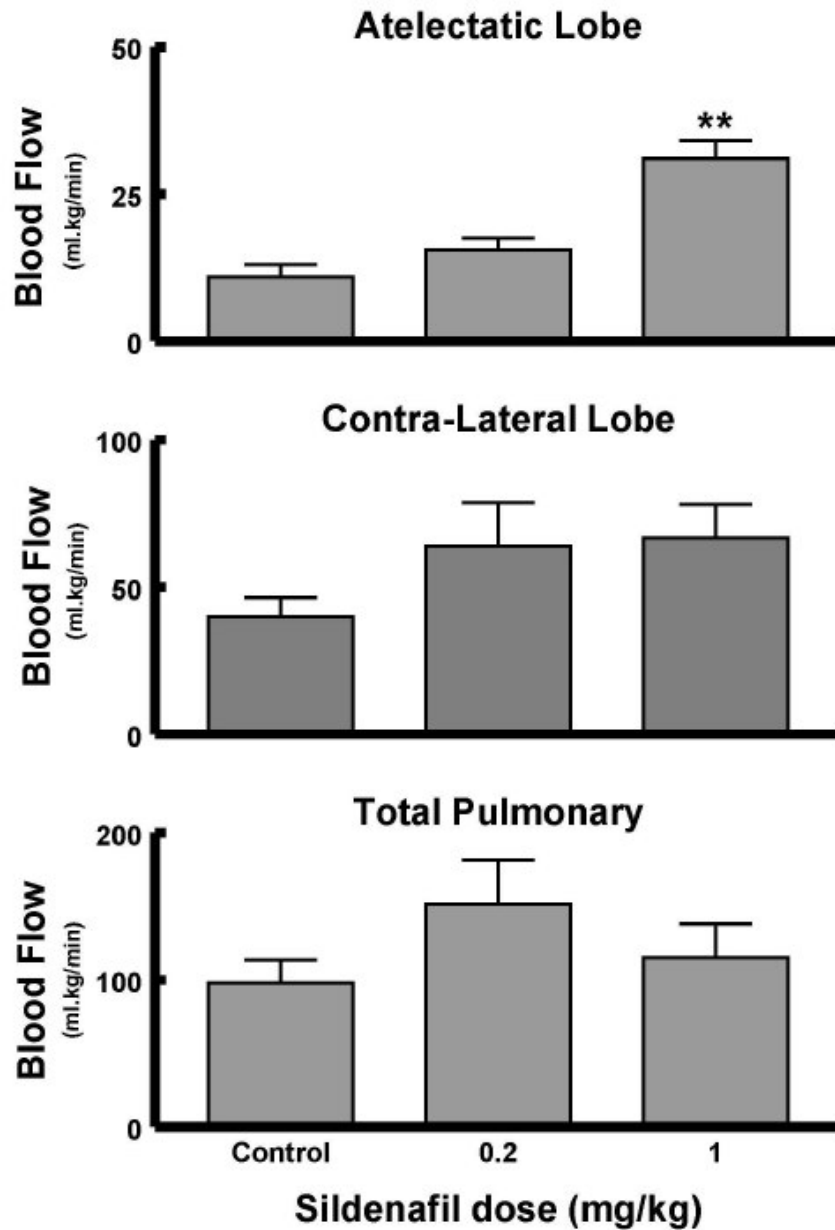


2. Representative MR blood-flow measurement in one animal.

(a) Anatomical slice depicting the artery feeding the right lower segment of the lung (arrow). **(b)** Two velocity maps corresponding to the boxed area in (a) but taken from different points in the cardiac cycle: systolic flow (top) and diastolic flow (bottom). Bright pixels indicate superior flow and dark pixels inferior flow. **(c)** Blood flow measured in the feeding artery before (circles) and after (triangles) atelectasis of the right lower segment of the lung. Flow integrated over the cardiac cycle was approximately 1.0 ml and 0.3 ml before and after collapse, respectively.

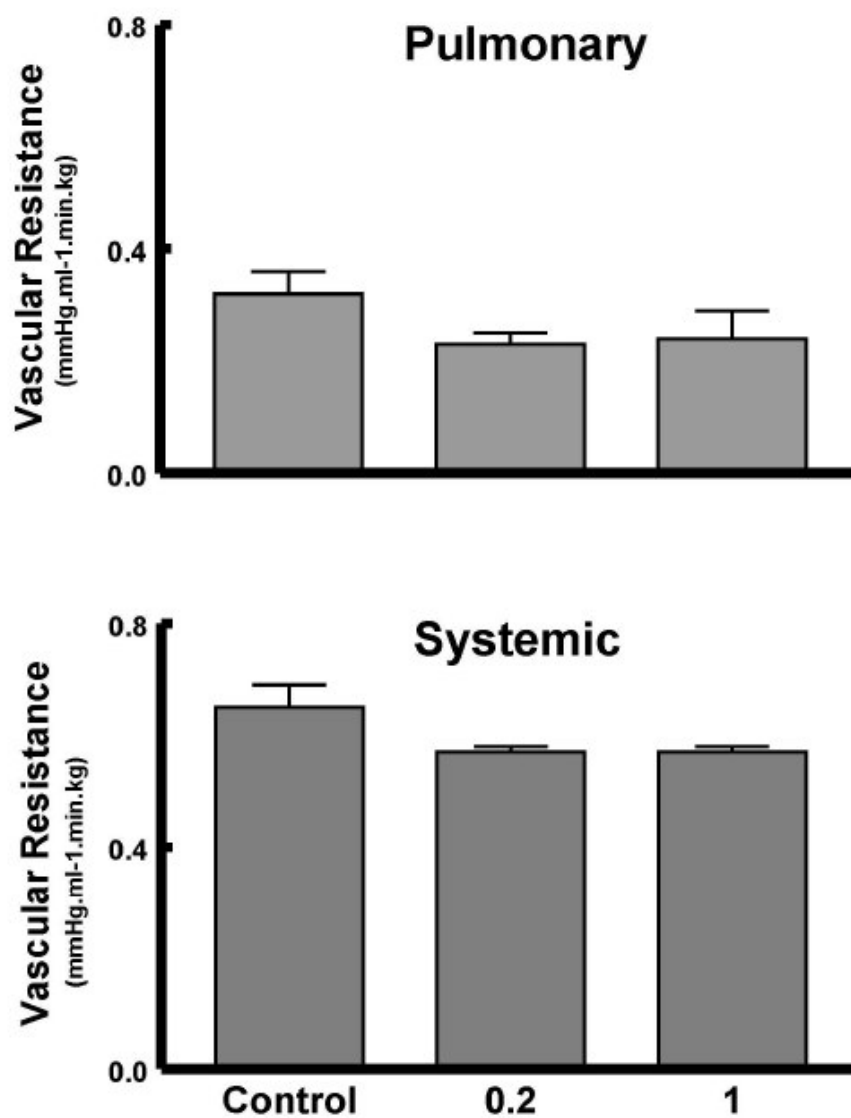


3. Mean systemic and pulmonary arterial pressures prior (control) (N=9), and 30 min after 0.2 (N=10) and 1 mg/kg (N=14) sildenafil iv administration. ** P<0.01 as compared with control values. * * P<0.01 as compared with 0.2 mg/kg dose

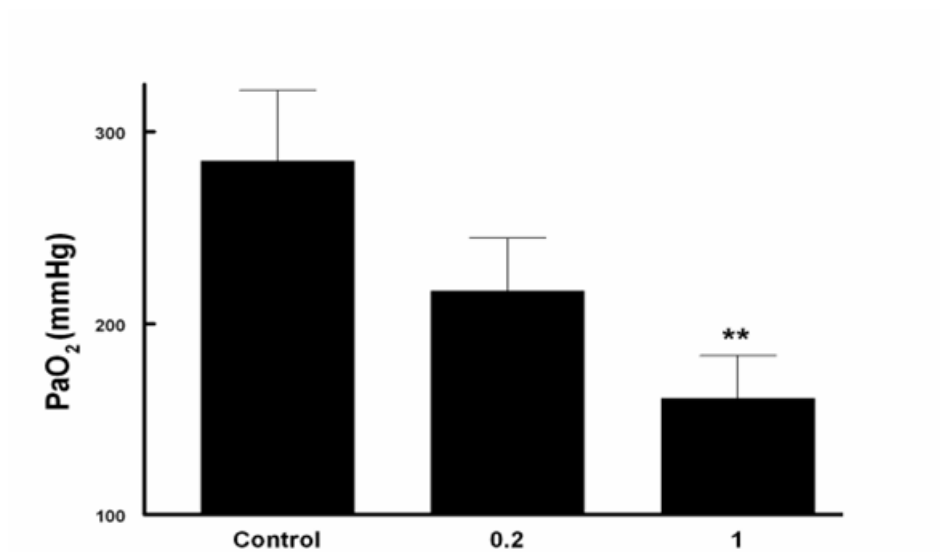


4. Atelectatic, contra-lateral lobes and total pulmonary blood flow prior (control) (N=3) and 30 min after 0.2 (N=3) and 1 mg/kg (N=3) sildenafil iv.

** P<0.01 as compared with control values.



5. Pulmonary and systemic vascular resistance changes for control (N=6), 0.2 (N=5) and 1 mg/kg (N=4) sildenafil administration.



6. Arterial oxygen tension (PaO₂) prior (control) (N=9), and 30 min after 0.2 (N=10) and 1 mg/kg (N=14) sildenafil iv administration. ** P<0.01 as compared with control values.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

Fomos capazes de confirmar a hipótese que o sildenafil reverte o fenômeno da vasoconstrição pulmonar hipóxica em porcos recém nascidos. Essa confirmação elucida o mecanismo da hipoxemia encontrada em pacientes portadores de hipertensão pulmonar tratados com sildenafil, quando da vigência de doenças do parênquima pulmonar.

Foi possível demonstrar que os porcos recém nascidos são capazes de responder a estímulos hipóxicos locais com uma diminuição importante do fluxo sanguíneo para as áreas do pulmão não ventiladas. Nossos achados reforçam as evidências que ao nascimento o reflexo da vasoconstrição pulmonar hipóxica já está totalmente desenvolvida nos porcos.

A hipótese que a vasoconstrição pulmonar hipóxica é mediada em parte pela atividade da fosfodiesterase 5 não pode ser confirmada, visto que as dosagens de cGMP do parênquima pulmonar não foram diferentes quando áreas atelectáticas e áreas ventiladas foram comparadas.

APÊNDICE

Banco de dados

Animal	PAM	PAPM	DC	Fluxo direita	Fluxo esquerda	PO2	Grupo	Situação
1	73	19	149	58	59	355	sildenafil 0.2	pre colapso
2	76	18	151	54	58	357	sildenafil 0.2	pre colapso
3	75	18	149	60	59	367	sildenafil 0.2	pre colapso
4	79	17	150	43	33	388	sildenafil 0.2	pre colapso
5	76	19	151	75	35	352	sildenafil 0.2	pre colapso
6	80	20	142	48	32	325	sildenafil 0.2	pre colapso
7	78	19	151	51	38	355	sildenafil 0.2	pre colapso
8	79	19	154	54	59	368	sildenafil 1	pre colapso
9	81	19	179	58	54	329	sildenafil 1	pre colapso
10	77	22	151	55	64	381	sildenafil 1	pre colapso
11	79	18	152	60	62	365	sildenafil 1	pre colapso
12	77	19	156	59	69	387	sildenafil 1	pre colapso
13	79	18	179	63	68	389	sildenafil 1	pre colapso
14	74	19	181	73	66	377	sildenafil 1	pre colapso
15	79	20	186	67	37	393	controle	pre colapso
16	77	18	180	75	47	389	controle	pre colapso
17	75	19	179	42	42	339	controle	pre colapso
18	76	19	186	52	45	386	controle	pre colapso
19	75	20	187	54	52	375	controle	pre colapso
20	79	19	146	61	60	382	controle	pre colapso

Animal	PAM	PAPM	DC	Fluxo direita	Fluxo esquerda	PO2	Grupo	Situação
1	75	24	146	26	67	270	sildenafil 0.2	colapso
2	75	23	134	26	69	231	sildenafil 0.2	colapso
3	75	25	151	17	70	267	sildenafil 0.2	colapso
4	75	24	139	27	62	288	sildenafil 0.2	colapso
5	76	25	129	17	71	237	sildenafil 0.2	colapso
6	75	25	137	20	75	278	sildenafil 0.2	colapso
7	77	23	142	18	77	287	sildenafil 0.2	colapso
8	79	23	160	19	79	308	sildenafil 1	colapso
9	77	23	154	19	78	254	sildenafil 1	colapso
10	75	22	135	17	61	281	sildenafil 1	colapso
11	77	24	151	27	77	265	sildenafil 1	colapso
12	75	24	159	19	75	287	sildenafil 1	colapso
13	77	25	132	28	77	269	sildenafil 1	colapso
14	77	25	149	19	78	277	sildenafil 1	colapso
15	75	25	149	20	75	287	controle	colapso
16	76	23	164	27	83	269	controle	colapso
17	75	25	167	17	93	254	controle	colapso
18	76	25	139	19	89	281	controle	colapso
19	76	23	141	20	93	275	controle	colapso
20	76	25	161	17	91	294	controle	colapso

Animal	PAM	PAPM	DC	Fluxo direita	Fluxo esquerda	PO2	Grupo	Situação
1	64	20	81	22,0	15	182	sildenafil 0.2	colapso + intervencao
2	56	22	282	10,0	24	134	sildenafil 0.2	colapso + intervencao
3	59	19	93	19,5	118	336	sildenafil 0.2	colapso + intervencao
4	58	14	145	19,0	94	311	sildenafil 0.2	colapso + intervencao
5	75	15	63	6,0	105	205	sildenafil 0.2	colapso + intervencao
6	78	18	241	16,0	25	133	sildenafil 0.2	colapso + intervencao
7	66	19	152	15,5	66	219	sildenafil 0.2	colapso + intervencao
8	54	13,0	58	40	45	101	sildenafil 1	colapso + intervencao
9	51	13,0	192	24	39	123	sildenafil 1	colapso + intervencao
10	53	19,0	50	21	25	102	sildenafil 1	colapso + intervencao
11	65	18,0	189	43	94	145	sildenafil 1	colapso + intervencao
12	64	19,0	41	35	98	240	sildenafil 1	colapso + intervencao
13	62	16,0	155	23	101	254	sildenafil 1	colapso + intervencao
14	59	17,0	115	32	68	162	sildenafil 1	colapso + intervencao
15	59	15,0	51	3	16	177	controle	colapso + intervencao
16	54	22,0	119	15	66	334	controle	colapso + intervencao
17	71	14,0	94	7	33	224	controle	colapso + intervencao
18	80	27,0	78	11	38	174	controle	colapso + intervencao
19	83	26,0	73	5	61	389	controle	colapso + intervencao
20	76	26,0	174	18	25	414	controle	colapso + intervencao