

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 28/06/2023.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**O óxido nítrico na hipertensão pulmonar canina**

**Jaislane Bastos Braz  
Médica Veterinária**

**2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**O óxido nítrico na hipertensão pulmonar canina**

**Discente: Jaislane Bastos Braz**

**Orientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

**2021**

B827o Braz, Jaislane Bastos  
O óxido nítrico na hipertensão pulmonar canina / Jaislane Bastos Braz. -- Jaboticabal, 2021  
49 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Aparecido Antonio Camacho

1. Doença respiratória. 2. Doença valvar mitral. 3. Nitrito. 4. Nitrato. 5. Óxido nítrico sintase. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

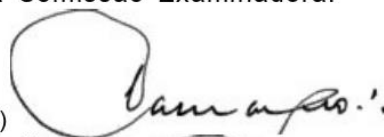
TÍTULO DA TESE: ÓXIDO NÍTRICO PLASMÁTICO INDIRETO EM CÃES COM HIPERTENSÃO PULMONAR SECUNDÁRIA OU NÃO À DOENÇA CARDÍACA ESQUERDA

**AUTORA: JAISLANE BASTOS BRAZ**

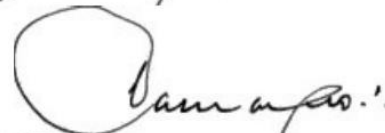
**ORIENTADOR: APARECIDO ANTONIO CAMACHO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Clínica Médica Veterinária pela Comissão Examinadora:

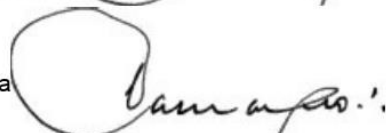
Prof. Dr. APARECIDO ANTONIO CAMACHO (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/Jaboticabal - Unesp



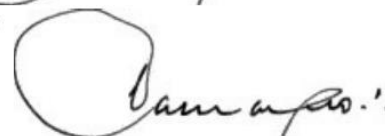
Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FÁBIO NELSON GAVA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínicas Veterinárias / Universidade Estadual de Londrina



Profa. Dra. LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHÃO (Participação Virtual)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. JOÃO PAULO DA EXALTAÇÃO PASCON (Participação Virtual)  
Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA / Uruguai/RS



Jaboticabal, 28 de junho de 2021

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Jaislane Bastos Braz, nascida 6 de junho de 1987, é graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Tocantins. Após a graduação, em 2011, trabalhou como médica veterinária fiscal agropecuária durante um ano na Defesa Agropecuária do estado do Tocantins (ADAPEC) lotada no município de Bom Jardim pertencente à regional de Pedro Afonso, Tocantins. Posteriormente, em 2012, realizou residência em Clínica Médica, Cirurgia e Anestesiologia de Animais de Companhia na Universidade Federal do Tocantins sob orientação do Prof. Dr. Marlos Gonçalves Sousa. Em seguida, em 2015, ingressou no curso de mestrado em Clínica Médica de Pequenos Animais com ênfase em Cardiologia Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Marlos Gonçalves Sousa e Coorientação do Prof. Dr. Aparecido Antônio Camacho. Durante esse período teve a oportunidade de atuar no atendimento clínico do serviço de cardiologia veterinária do Hospital Veterinário da UNESP, campus de Jaboticabal, São Paulo, que se estendeu até o doutorado. Durante o mesmo período, participou como monitora em cursos de eletrocardiografia veterinária, ecocardiografia veterinária e aperfeiçoamento em cardiologia veterinária promovidos pela Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão (FUNEP). Participou de aulas da disciplina de clínica médica ministrando aula teórica sobre o sistema cardiorrespiratório e também de aulas práticas de eletrocardiografia para a disciplina de fisiologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP. Atualmente, está no último ano de doutorado em Cardiologia Veterinária, na mesma instituição, iniciado em 2018 sob a orientação do Prof. Dr. Aparecido Antônio Camacho.

## **AGRADECIMENTOS**

Gratidão é uma palavra que aprendi que ao longo da minha vida a usar não só como palavra, mas a sentir com toda a intensidade que merece. Sou grata a Deus pela minha vida, saúde e força de ação que me impulsionaram a realizar o grande sonho de me tornar doutora. Sou mais grata ainda pelas dificuldades que enfrentei, pois essas me tornaram uma pessoa e profissional melhor do que já fui no passado. Sou grata a Deus também pelas pessoas incríveis que colocou na minha trajetória para me ajudarem de alguma forma a chegar no momento presente com toda a bagagem que carrego de conhecimento técnico e tese concluída, mas principalmente a bagagem de sabedoria de vida pelas grandes experiências que me proporcionaram, palavras amigas, apoio emocional e acolhimento. Deus tem sido muito bom comigo, ganhei colegas de profissão que são amigos para a vida!

Gratidão à minha família que sempre me apoiou incondicionalmente em tudo o que necessitei e sempre foram meus maiores incentivadores a buscar realizar meus sonhos e nunca mediram esforços para que eu obtivesse sucesso nas minhas escolhas. O meu amor por vocês é maior do que eu consiga expressar por palavras. A todos, em especial a família mais íntima, mãe Crenilda, pai Gilberto, irmã Jaciane, irmão Jader, cunhada Rosângela, sobrinhos Nirvana Lissa e Otávio e noivo Alexandre, eu amo muito vocês.

Gratidão à equipe de cardiologia pelo companheirismo, acolhimento e oportunidade de me tornar melhor profissional aprendendo junto com vocês a cada dia. O nosso serviço de cardiologia sempre foi marcado pela grande harmonia, apoio e amizade entre todos nós! Gratidão a Raphaela, Tamyris, Beatriz, Murillo e Matheus, juntos vivemos grandes momentos no atendimento, nas pesquisas, nos estudos e também demos muita risada, nos acolhemos e construímos uma amizade forte.

Gratidão em especial às Cardiogirls, como nos chamamos carinhosamente, Tamyris, Rapahela e Beatriz. Vocês são um porto seguro para mim, compartilhamos nossas inseguranças, nos apoiamos nos novos projetos e nos empoderamos da nossa energia feminina que nos torna tão fortes. Eu admiro intensamente cada uma de vocês. Gratidão Tamyris pelo acolhimento em momentos tão difíceis na vida

peçoal e acadêmica, sem o seu apoio teria sido bem mais difícil, e hoje expresso meu reconhecimento e amizade.

Gratidão às amizadas que a UNESP me trouxe, Valéria, Nathália, Vanessa, Jorge, Andres e a cada um que de alguma maneira me trouxe momentos de alegria, descontração, ou apoio e acolhimento.

Gratidão à Universidade Estadual Paulista pela oportunidade de realizar o Doutorado em uma instituição tão estimada e constituída por prezados profissionais de todas as áreas. Gratidão ao Hospital Veterinário da UNESP e a toda equipe que proporcionou o meu aprendizado e pesquisa no atendimento clínico aos pacientes. Gratidão ao laboratório de Patologia Clínica e a sua equipe que preparou as amostras para a análise. Gratidão à professora Evelin Capellari Cárnio, ao Marcelo Eduardo Batalhão e à Escola de Enfermagem da UPS de Ribeirão Preto que contribuiu com uma análise essencial da pesquisa de Doutorado, aqui expresso meus sinceros agradecimentos e consideração. Gratidão ao Roberto Ampuero Navarrete por toda a dedicação e contribuição com a análise estatística e pela amizade. Gratidão à pós-graduação e sua equipe que trabalha de forma organizada para garantir que todos os processos ocorram corretamente para cada acadêmico.

Gratidão a todos os professores que se dedicaram para contribuir para o aprimoramento dessa tese nas bancas de qualificação e defesa, o meu reconhecimento à professora Luciane Helena Gargaglioni Batalhão, Annelise Carla Camplesi, João Paulo Da Exaltação Pascon, Mirela Tinucci Costa, Fábio Nelson Gava.

Gratidão também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da minha bolsa de estudo que permitiu a minha dedicação à pesquisa.

Gratidão ao meu orientador Professor Aparecido Antonio Camacho que é o grande provedor da minha trajetória na pós-graduação e, por isso, dedico a ele o meu agradecimento especial.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Gratidão ao meu orientador Aparecido Antonio Camacho que dedicou a sua vida a contribuir com o ensino e nunca negou o conhecimento a cada um que o procurasse. Eu tenho uma grande admiração pelo profissional dedicado, altamente capacitado e que venceu grandes desafios para desbravar o mundo da cardiologia veterinária e abrir as portas para que essa especialidade se tornasse acessível. Eu sou grata pelo acolhimento que iniciou no mestrado e se estendeu até o doutorado, onde pude aprender a fazer pesquisa e a exercer a cardiologia de forma grandiosa como o senhor a faz. O relacionamento profissional nos aproximou e sempre pude contar com o seu acolhimento nos momentos difíceis e também compartilhamos momentos de alegria. Suas palavras de sabedoria e aconselhamento estão guardadas no meu coração e as aplico cotidianamente. Gratidão, meu querido professor, pelos ensinamentos que vão além da sala de aula. Com toda a certeza posso dizer que é uma honra concluir o doutorado sob a sua orientação. Dedico ao senhor todo o meu reconhecimento. Gratidão!

**SUMÁRIO**

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais</b> .....	<b>1</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>Revisão de Literatura</b> .....	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Óxido nítrico plasmático em cães com hipertensão pulmonar secundária ou não à doença cardíaca esquerda</b> .....	<b>16</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>16</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>17</b>
<b>Materials and methods</b> .....	<b>20</b>
<b>Results</b> .....	<b>24</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>29</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>35</b>
<b>References</b> .....	<b>36</b>

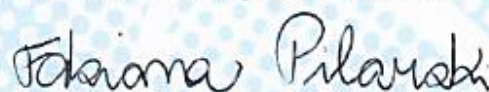
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Endotelina-1 e óxido nítrico como biomarcadores da hipertensão pulmonar pré e pós-capilar em cães e função ventricular direita”**, protocolo nº 010488/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de agosto de 2018.

Vigência do Projeto	08/08/2018 a 08/08/2020
Espécie / Linhagem	Canina / Qualquer raça
Nº de animais	60
Peso / Idade	Entre 2 e 30 Kg
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Tutores que levarem cães para avaliação cardiológica no Hospital Veterinário – UNESP / Jaboticabal e Laboratório de Nutrição Clínica – UNESP / Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de agosto de 2018.

**Profª Drª Fabiana Pilarski**

Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil  
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

## O óxido nítrico na hipertensão pulmonar canina

**RESUMO** - O óxido nítrico (ON) é uma molécula volátil regulada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Participa de muitas funções no organismo, como no coração, pulmão, encéfalo e rins. Fisiologicamente, está relacionado à regulação dos vasos sanguíneos associado a outros mediadores, como a endotelina 1 e prostaciclina, garantindo nos pulmões uma circulação de baixa pressão, baixa resistência e alta capacitância, promovida pelo seu efeito vasodilatador. A liberação de NO pelo endotélio ocorre pela força de cisalhamento do sangue no vaso sanguíneo. Na hipertensão pulmonar (HP), em seres humanos, há desregulação dos vasoconstritores e vasodilatadores na circulação pulmonar, onde a diminuição da biodisponibilidade do ON promove um efeito vasoconstritor responsável pelo aumento da pressão arterial pulmonar. Essa tese foi desenvolvida com o objetivo de promover mais esclarecimento sobre a fisiopatologia da HP e o papel do ON na espécie canina por meio do embasamento teórico que contempla uma revisão de literatura, bem como por meio da pesquisa prospectiva que avaliou a concentração de ON plasmático pelo método de quimioluminescência NO/ozônio pela dosagem de nitrito/nitrato em cães com HP secundária à doença do lado esquerdo do coração (LHD) ou não secundária à doença cardíaca esquerda. O estudo incluiu 35 cães com probabilidade de HP estimada pelo exame ecocardiográfico do ventrículo direito, átrio direito e artéria pulmonar e classificada em baixa, intermediária ou alta de acordo com os critérios propostos pelo consenso de HP canina. Além disso, o exame ecocardiográfico permitiu também classificar a HP secundária à LHD (n=18 cães), e não secundária à LHD os cães sem remodelamento atrial esquerdo (n=17 cães). O valor de ON foi maior nos cães com HP secundária à LHD ( $p=0.002$ ), enquanto que a diferença não foi significativa em relação à probabilidade baixa, intermediária ou alta de HP. Em conclusão, o presente estudo mostrou que a maior concentração de NO nos cães com HP secundária a LHD permitiu diferenciá-los dos cães com HP sem remodelamento cardíaco esquerdo. Entretanto, não foi possível diferenciar a probabilidade de HP com base na concentração de NO, embora houvesse uma tendência a aumentar a concentração do NO à medida que a probabilidade de HP e o remodelamento atrioventricular direito aumentasse.

**Palavras-chave:** doença respiratória, doença valvar mitral, nitrato, nitrito, óxido nítrico sintase, vasoconstrição, vasodilatação

## NITRIC OXIDE IN CANINE PULMONARY HYPERTENSION

**ABSTRACT** - Nitric oxide (NO) is a volatile molecule regulated by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). It participates in many functions in the body, such as in the heart, lung, brain and kidneys. Physiologically, it is related to the regulation of blood vessels associated with other mediators, such as endothelin 1 and prostacyclins, ensuring a low pressure, low resistance and high capacitance circulation in the lungs, promoted by its vasodilator effect. The release of NO by the endothelium occurs by the shear force of the blood in the blood vessel. In pulmonary hypertension (PH), in humans, there is dysregulation of vasoconstrictors and vasodilators in the pulmonary circulation, in which the decrease in NO bioavailability promotes a vasoconstrictor effect responsible for the increase in pulmonary arterial pressure. This doctoral thesis was developed with the aim of providing further clarification on the pathophysiology of PH and the role of NO in the canine species through a theoretical basis that includes a literature review and a prospective study. This research evaluated the plasma NO concentration by the NO/ozone chemiluminescence method by measuring nitrite/nitrate in dogs with PH secondary to left heart disease (LHD) or not secondary to left heart disease. The evaluation was performed in 35 dogs with probability of PH estimated by echocardiographic examination of the right ventricle, right atrium and pulmonary artery and classified as low, intermediate or high according to the criteria proposed by the consensus of canine PH. The echocardiographic examination also allowed classifying PH secondary to LHD (n=18 dogs), and not secondary to LHD, dogs without left atrial remodeling (n=17 dogs). The ON value was higher in dogs with HP secondary to LHD (p=0.002), as the difference was not significant in relation to low, intermediate or high probability of HP. In conclusion, the present study showed that the higher concentration of NO in dogs with PH secondary to LHD enabled the differentiation of dogs with PH without left cardiac remodeling. However, it was not possible to differentiate the probability of PH based on the concentration of NO, although there was a tendency to increase the concentration of NO as the probability of PH and right atrioventricular remodeling increased.

**Keywords:** myxomatous mitral valve disease, nitrate, nitric oxide synthase, nitrite, respiratory disease, vasoconstriction, vasodilatation

## **CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais**

### **Introdução**

A hipertensão pulmonar (HP) é uma síndrome responsável pela piora da qualidade de vida e prognóstico de cães, especialmente porque a forma secundária é a mais comum nessa espécie e caracteriza o agravamento dos sinais clínicos da doença de base por piora da função cardíaca e remodelamento vascular pulmonar (Borgarelli et al., 2015; Kellihan & Stepien, 2010).

A instalação da HP em cães ocorre por três mecanismos distintos: como consequência do hiperfluxo sanguíneo, ou aumento da pressão hidrostática venosa, ou aumento de resistência dos vasos pulmonares (Reinero et al., 2020). Independente do mecanismo de instalação da HP, todos eles culminando em aumento da pressão ventricular direita (aumento da pós-carga) que promove insuficiência da válvula tricúspide e, conseqüentemente, disfunção sistólica do ventrículo direito e sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) direita (Reinero et al., 2020).

A origem da HP, em seres humanos, também está relacionada à fatores primários e secundários, sendo os fatores primários bastante comuns na população e é caracterizada por alteração dos mediadores reguladores da vasodilatação e vasoconstrição no leito vascular pulmonar que favorecem a vasoconstrição e aumentam a resistência vascular pulmonar (Frost et al., 2019). Alguns mediadores vasoativos têm um papel importante na fisiologia da circulação pulmonar e são liberados pelas células endoteliais para regular o tônus vascular, o remodelamento vascular e a inflamação (Tabima et al., 2012). Dentre esses mediadores, destaca-se o óxido nítrico (ON), a endotelina-1(ET-1) e as prostaciclina (Chester et al., 2017). O ON tem função de promover o relaxamento do endotélio e está relacionado a menor biodisponibilidade na hipertensão arterial pulmonar em seres humanos (Chester et al., 2017).

Além disso, tratamentos baseados em doadores de NO ou que aumentam a sua biodisponibilidade têm sido empregados com bons resultados em seres humanos com HP (Chester et al., 2017). Da mesma forma, em cães, o tratamento com inibidores

da fosfodiesterase apresentam resultados positivos na melhora da qualidade de vida (Kellum e Stepien, 2007). Entretanto, apesar dessa resposta animadora no tratamento, ainda não são suficientes os estudos para caracterizar o envolvimento fisiopatológico do óxido nítrico na HP canina, assim como no tratamento desses pacientes (Bueno *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2010; Jafey *et al.*, 2019). Por tanto, o objetivo geral dessa pesquisa é identificar a concentração do óxido nítrico em cães com hipertensão pulmonar e revisar na literatura a relevância do óxido nítrico tanto no processo de instalação, quanto na progressão e tratamento dessa síndrome.

## Referências Bibliográficas

Anand A, Srivastava N, Barwad P, Ramakrishnan S, Roy A, Bhargava B (2014) Dyspnea in Eisenmenger syndrome and its amelioration by sildenafil: role of J receptors. **International Journal of Cardiology** 174:574-578.

Barberà JA, Román A, Gómez-Sánchez MÁ, Blanco I, Otero R, López-Reyes R, Otero I, Pérez-Peñate G, Sala E, Escribano P (2018) Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension: Summary of Recommendations. **Archivos de Bronconeumología** 54:205-215.

Barrachina MD, Panes J, Esplugues JV (2001) Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. **Current Pharmaceutical Design** 7:31-48.

Bach JF, Rozanski EA, MacGregor J, Betkowski JM, Rush JE (2006) Retrospective evaluation of sildenafil citrate as a therapy for pulmonary hypertension in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 20:1132-1135.

Borgarelli M, Abbott J, Braz-Ruivo L, Chiavegato D, Crosara S, Lamb K, Ljungvall I, Poggi M, Santilli RA, Haggstrom J (2015) Prevalence and prognostic importance of pulmonary hypertension in dogs with myxomatous mitral valve disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 29:569-574.

Braz JB, Camacho AA, Canola RAM, Beluque T, Zaché E, Silva Filho JC, Ampuero RAN, Zamora WA, Sousa MG (in press) Echocardiographic features of pre- and postcapillary pulmonary hypertension with a focus on the right ventricle in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 41.

Brown AJ, Davison E, Sleeper MM (2010) Clinical efficacy of sildenafil in treatment of pulmonary arterial hypertension in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 24:850-854.

Bueno M, Wang J, Mora AL, Gladwin MT (2013) Nitrite signaling in pulmonary hypertension: mechanisms of bioactivation, signaling, and therapeutics. **Antioxidants & Redox Signaling** 18:1797-1809.

Cerqueira NF, Yoshida WB (2002) Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira** 17:417-423

Chester AH, Yacoub MH, Moncada S (2017) Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension. **Global Cardiology Science and Practice** 2017:1-16.

Chirinos JA, Zamani P (2016) The Nitrate-Nitrite-NO Pathway and Its Implications for Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. **Current Heart Failure Reports** 13:47-59.

De Laforcade AM, Freeman LM, Rush JE (2003) Serum nitrate and nitrite in dogs with spontaneous cardiac disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 17:315-318.

Dias-Junior CA, Cau SB, Tanus-Santos JE (2008) Papel do óxido nítrico na regulação da circulação pulmonar: implicações fisiológicas, fisiopatológicas e terapêuticas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia** 34:412-419.

Drexler H, Kurz S, Jeserich M, Münzel T, Hornig B (1995) Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with chronic heart failure. **The American Journal of Cardiology** 76:13E-18E.

Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. 33(7):829-37, 837a-837d.

Flora Filho R, Zilberstein B (2000) Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira** 46:265-271.

Frost A, Badesch D, Gibbs JSR, Gopalan D, Khanna D, Manes M, Oudiz R, Satoh T, Torres F, Torbicki A (2019) Diagnosis of pulmonary hypertension. **European Respiratory Journal** 53:1-12.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 288:373-376.

Fukumoto S, Hanazono K, Miyasho T, Endo Y, Kadosawa T, Iwano H, Uchide T (2014) Serum big endothelin-1 as a clinical marker for cardiopulmonary and neoplastic diseases in dogs. **Life Sciences** 118:329-332.

Hornig B, Arakawa N, Drexler H (1998) Effect of ACE inhibition on endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure. **European Heart Journal** 48-53.

Jaffey JA, Leach SB, Kong LR, Wiggen KE, Bender SB, Reiner CR (2019) Clinical efficacy of tadalafil compared to sildenafil in treatment of moderate to severe canine pulmonary hypertension: a pilot study. **Journal of Veterinary Cardiology** 24:7-19.

Kiechele FL, Malinski T (1993) Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **American Journal of Clinical Pathology** 100:567-575.

Kellihan HB, Stepien RL (2010) Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 40:623-641.

Kellihan HB, Stepien RL (2012) Pulmonary hypertension in canine degenerative mitral valve disease. **Journal of Veterinary Cardiology** 14:149-164.

Kellum HB, Stepien RL (2007) Sildenafil citrate therapy in 22 dogs with pulmonary hypertension. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 21:1258-1264.

Krieger EV, Leary PJ, Opatowsky AR (2015) Pulmonary Hypertension in Congenital Heart Disease: Beyond Eisenmenger Syndrome. **Cardiology Clinics** 33:599-609.

Levine AB, Punhaole D, Levine TB (2012) Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. **Cardiology** 122:55-68.

Moceri P, Kempny A, Liodakis E, Alonso Gonzales R, Germanakis I, Diller GP, Swan L, Marino PS, Wort SJ, Babu-Narayan SV, Ferrari E, Gatzoulis MA, Li W, Dimopoulos K (2015) Physiological differences between various types of Eisenmenger syndrome and relation to outcome. **International Journal of Cardiology** 179:455-460.

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** 327:524-526.

Poser H, Berlanda M, Monacolli M, Contiero B, Coltro A, Guglielmini C (2017) Tricuspid annular plane systolic excursion in dogs with myxomatous mitral valve disease with and without pulmonary hypertension. **Journal of Veterinary Cardiology** 19:228-239.

Reinero C, Visser LC, Kellihan HB, Masseau I, Rozanski E, Clercx C, Williams K, Abbott J, Borgarelli M, Scansen BA (2020) ACVIM consensus statement guidelines for the diagnosis, classification, treatment, and monitoring of pulmonary hypertension in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 34:549-573.

Scansen BA, Simpson EM, López-Alvarez J, Thomas WP, Bright JM, Eason BD, Rush JE, Dukes-McEwan J, Green HW, Cunningham SM, Visser LC, Kent AM, Schober KE (2015) Pulmonary artery dissection in eight dogs with patent ductus arteriosus. **Journal of Veterinary Cardiology** 17:107-119.

Schober KE, Baade H (2006) Doppler echocardiographic prediction of pulmonary hypertension in West Highland white terriers with chronic pulmonary disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 20:912-920.

Shapira S, Kadar T, Weissman BA (1994) Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. **Brain Research** 668:80-84

Stabile AM, Moreto V, Batalhão ME, Rocha MJ, Antunes-Rodrigues J, Cárnio EC (2016) Differential Role of Neurohypophysial Hormones in Hypotension and Nitric Oxide Production During Endotoxaemia. **Journal of Neuroendocrinology** 28:1-6.

Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT (2012) Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. **Free Radical Biology and Medicine** 52:1970-86

Tessier-Vetzel D, Tissier R, Chetboul V, Carlos C, Nicolle A, Benbaron D, Dandrieux J, Thoulon F, Carayon A, Pouchelon JL (2006) Diagnostic and prognostic value of endothelin-1 plasma concentrations in dogs with heart and respiratory disorders. **Veterinary Record** 158:783-788.

Ziche M, Morbidelli L (2000) Nitric oxide and angiogenesis. **Journal of Neuro-Oncology** 50:139-148.

Zweier JL, Li H, Samouilov A, Liu X (2010) Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall. **Nitric Oxide** 15;22(2):83-90.