

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

O óxido nítrico na hipertensão pulmonar canina

Jaislane Bastos Braz
Médica Veterinária

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. Nitrito. 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

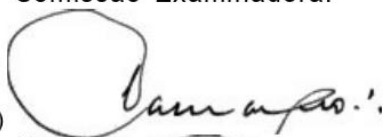
TÍTULO DA TESE: ÓXIDO NÍTRICO PLASMÁTICO INDIRETO EM CÃES COM HIPERTENSÃO PULMONAR SECUNDÁRIA OU NÃO À DOENÇA CARDÍACA ESQUERDA

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:

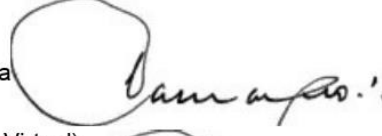
Prof. Dr. APARECIDO ANTONIO CAMACHO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/Jaboticabal - Unesp



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 Raphaella, 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

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

Gratidão às amigadas 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

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

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.

Revisão de Literatura

Óxido nítrico

O óxido nítrico é uma molécula volátil que foi descoberta em 1980 por Furchogott e Zawadzki ficando conhecida como fator de relaxamento dependente do endotélio (Cerqueira e Yoshida, 2002). Posteriormente, em 1987, Palmer *et al.* descobriram que se tratava de um radical livre e foi nomeada a “Molécula do Ano” em 1992 (Cerqueira e Yoshida, 2002). O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, presente em pequenas quantidades no ar atmosférico, e altamente reativo pela presença de radical livre (elétron extra), o que confere meia-vida extremamente curta, de menos de 10 segundos quando diluído, sendo então convertido à nitrito e nitrato (Flora Filho e Zilberstein, 2000).

Formação e regulação do ON no organismo

A liberação do ON nos vasos sanguíneos pode ser estimulada por várias substâncias, embora, a força de cisalhamento do sangue contra a parede do vaso seja o fator principal (Chester *et al.*, 2017). Após o estímulo, o ON é formado a partir da clivagem enzimática da L-arginina pela óxido-nítrico sintase (NOS), que tem afinidade pelo isômero L e não exerce atividade sobre o isômero D (Chester *et al.*, 2017). As NOS estão presentes em três isoformas: duas constitutivas, a endotelial (eNOS) e a

neuronal (nNOS), e uma induzida (iNOS), das quais, cada isoforma produz ON para exercer funções biológicas diferentes (Cerqueira e Yoshida, 2002).

A via clássica de formação do ON ocorre a partir da L-arginina que é convertida em um intermediário chamado N-hidroxi-L-arginina, para esse processo necessita a presença do cofator fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzido (NADPH) e Ca^{+} e, na sequência, o intermediário é convertido a citrulina com a participação de NADPH e O_2 (Figura 1) (Flora Filho e Zilberstein, 2000; Förstermann e Sessa, 2012). Ou seja, nas células endoteliais vasculares com presença de oxigênio, a eNOS catalisa a conversão da porção terminal da L-arginina que dá origem a uma molécula de ON (radical livre gasoso) e L-citrulina (Cerqueira e Yoshida, 2002).

A ligação do Ca^{+} com a calmodulina ativa as NOS constitutivas, eNOS e nNOS, havendo a necessidade de manutenção da concentração Ca^{+} intracelular para manter a atividade enzimática e isso permite a liberação de baixas quantidades de NO (Flora Filho e Zilberstein, 2000). Por outro lado, a iNOS é ativada pela ligação de Ca^{+} com a calmodulina, mas é independente da concentração de Ca^{+} para se manter ativa, esta é induzida por estímulos inflamatórios com consequente liberação de ON em grandes quantidades enquanto o estímulo inflamatório estiver presente (Dias-Junior *et al.*, 2008).

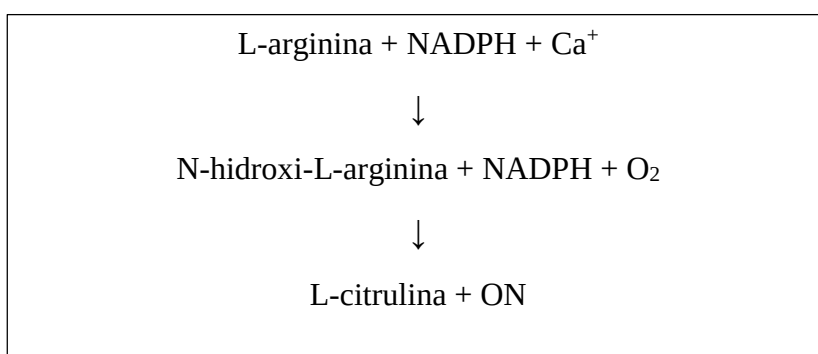


Figura 1. Via clássica de formação do ON a partir de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase. NOS, óxido nítrico sintase; ON, óxido nítrico.

Alguns estudos têm demonstrado que o nitrito parece não ser apenas um produto do ON, mas também um agente precursor de ON, especialmente controlado

pela pressão de oxigênio e pH (Zweier et al., 2010). Esse ON dependente do nitrito parece ter papel fisiológico e patológico e, por isso, essa via tem sido alvo de estudos com função farmacológica para atuação na hipertensão pulmonar e doenças cardiovasculares em seres humanos (Chirinos e Zamani, 2016). O nitrito disponível nos tecidos (em concentração micromolares) é convertido à ON diante da intensa redução do pH (Zweier et al., 2010). Como por exemplo, na isquemia, o pH pode reduzir para cerca de 5,5 e o nitrito pode ser uma fonte importante para formação de NO nessa situação (Zweier et al., 2010). O nitrito pode ser oriundo da NOS, que converte ON em nitrito, ou pode vir da dieta (Chirinos e Zamani, 2016). Resumidamente, a literatura apresenta como possibilidades que a NOS atua na formação do ON sob condições normóxicas, enquanto que sob condição de hipóxia, a presença de acidose celular por redução do pH, estimula a formação de NO a partir de nitrito.

Mecanismo de ação e função do óxido nítrico no organismo

O óxido nítrico atua em várias funções no organismo tal como, a ação de vasodilatador dependente do endotélio (Furchgott and Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987; Levine et al., 2012), bem como agente protetor da mucosa intestinal, promovendo também imunoregulação da inflamação da mucosa (Barrachina et al., 2001). Além disso, possui participação na patofisiologia de vários órgãos, incluindo os pulmões, como em situações de hipóxia e na hipertensão pulmonar. Outro órgão importante é o coração, como, por exemplo, o ON pode estar relacionado à aterosclerose de artérias coronárias, em seres humanos (Kiechele e Malinski, 1993; Levine et al., 2012), além de já ter sido relacionado também à fisiopatologia da trombose quando sua biodisponibilidade está diminuída (Levine et al., 2012). O ON também regula mecanismos benéficos no encéfalo durante a isquemia, mas, em contrapartida, quando em excesso pode ser neurotóxico (Shapira et al., 1994). Outro papel do NO é na angiogênese, que é atenuada quando a biodisponibilidade de NO está reduzida (Ziche e Morbidelli, 2000). Essa variação dos efeitos do ON em ações biológicas e patológicas ocorre de acordo com a concentração ou depuração tecidual de ON, significando que esses fatores são determinantes para um efeito benéfico ou

potencialmente tóxico, uma vez que a sinalização celular do ON não necessita de receptores transmembranosos, dado que apresenta alta capacidade de difusão, logo, a sinalização é diretamente intracelular (Flora Filho and Zilberstein, 2000).

Na circulação pulmonar, o relaxamento vascular mediado pelo ON ocorre diante da força de cisalhamento do sangue sobre o endotélio, da mesma forma em que ocorre em outros vasos sanguíneos (Chester et al., 2017). A vasodilatação ocorre quando o ON atravessa o endotélio e estimula o relaxamento das células musculares lisas (Cerqueira e Yoshida, 2002). A maioria das atividades mediadas pelo ON envolvem a formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que por sua vez ativa quinases dependentes de GMPc, que levam a ativação do fosfato de miosina com liberação subsequente de Ca^{+} intracelular, o que permite que as células musculares lisas relaxem (Chester et al., 2017). A vasodilatação vai permanecer enquanto houver difusão do ON para as células musculares lisas, de modo que, uma maior biodisponibilidade de ON aumenta a vasodilatação, ao passo que, se a biodisponibilidade diminuir, ocorre uma vasoconstrição moderada, como já assinalado (Cerqueira e Yoshida, 2002).

O efeito do ON é interrompido quando a enzima fosfodiesterase quebra o GMPc. Entretanto, a biodisponibilidade excessiva de espécies derivadas do oxigênio, como o superóxido (O_2^{-}) ou mudanças nos efeitos protetores de antioxidantes endógenos inativam os efeitos do ON (Chester et al., 2017). Tanto o ON quanto os seus radicais podem interagir com moléculas e modificá-las. São fontes de superóxidos as NADPH oxidases, xantina oxidase, enzima citocromo P450 e complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, bem como, em situações patológicas severas, pode-se citar o processo de desacoplamento da NOS (Chester et al., 2017).

A descoberta de inibidores das NOS permitiu aprofundar os estudos sobre a função do NO, onde a síntese de citrulina pode ser inibida por análogos da L-arginina como NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), NG-nitro-L-arginina (L-NNA) e NG-nitro-L-arginina-metiléster (L-NAME) (Chester et al., 2017; Flora Filho and Zilberstein, 2000). Estes agem como inibidores competitivos da NOS e, segundo Dias-Junior et al. (2008), a maioria dos estudos envolvendo a administração de inibidores das NOS em

animais não causaram aumento da pressão arterial pulmonar, enquanto que a pressão arterial sistêmica se elevou, demonstrando a participação do ON na homeostase da pressão sistêmica tanto na administração aguda quanto crônica desses fármacos. Por outro lado, Dias-Junior et al. (2008) relataram que a administração em doses altas de inibidores da NOS em seres humanos aumentou a pressão pulmonar, enquanto que a administração de doses baixas aumentou a pressão arterial sistêmica, mas não afetou a pressão da circulação pulmonar.

Como mensurar o ON

O óxido nítrico é uma molécula gasosa que tem meia-vida muito curta, cerca de menos de 10 segundos, o que dificulta a sua mensuração direta (Flora Filho and Zilberstein, 2000). Assim, muitas vezes, os seus precursores ou metabólitos são utilizados para estimar a biodisponibilidade de ON de forma indireta (Kiechele e Malinski, 1993).

Cerqueira e Yoshida (2002) resumem as possibilidades de determinar a presença de ON em seres vivos por meio do seu efeito biológico, como no caso de se avaliar o relaxamento vascular, a ativação da guanilato ciclase, mensurar a produção de GMPc, a produção de citrulina, a inibição da agregação plaquetária. Ou os análogos da L-arginase, já mencionados.

A técnica de espectrofotometria é utilizada para determinar a concentração de nitrito e nitrato plasmático em cães, onde a enzima nitrato redutase é adicionada à amostra para a conversão de nitrato a nitrito, e depois o reagente Greiss é usado para converter o nitrito em um componente violeta (de Laforcade et al., 2003).

A técnica de quimioluminescência ON/Ozônio também é um método indireto de mensurar ON a partir da conversão em nitrito/nitrato presente na amostra, onde após a reação, o ON se converte parte em nitrito e parte em nitrato, os quais são dosados e, assim, estimada a concentração de NO (Stabile et al., 2016).

Independente da técnica escolhida para mensurar o ON, todas as vantagens e desvantagens devem ser consideradas cuidadosamente antes de selecionar um método (Kiechele e Malinski, 1993).

Hipertensão pulmonar em cães

A hipertensão pulmonar em cães é definida pelo aumento anormal da pressão dentro da vasculatura pulmonar e depende de fatores desencadeantes, como o aumento do fluxo sanguíneo pulmonar, o aumento da resistência vascular pulmonar (RVP) e o aumento sustentado da pressão atrial esquerda (Reinero et al, 2020).

O hiperfluxo causa liberação de substâncias vasoativas que promovem vasoconstrição com o intuito de proteger os capilares pulmonares do excesso de fluxo sanguíneo, mas, cronicamente, esse processo adaptativo causa remodelamento permanente dos vasos, que inclui proliferação da camada íntima e hipertrofia da camada muscular lisa das artérias (Fleming e Ettinger, 2019).

Os shunts da esquerda para a direita são os principais responsáveis pela HP por hiperfluxo sanguíneo em cães, sendo a persistência do ducto arterioso a doença mais frequente (Reinero et al, 2020). Os cães desenvolvem insuficiência cardíaca congestiva (ICC) secundária ao shunt e em consequência do aumento da pressão do lado direito coração e da artéria pulmonar, o que se agrava e provoca a reversão do shunt, que se torna da direita para a esquerda, se um procedimento cirúrgico de correção não for realizado antes (Scansen et al., 2015). A reversão do shunt caracteriza a síndrome de Eisemenger (Anand et al., 2014; Moceri et al., 2015; Krieger et al., 2015), entretanto, essa síndrome é vista com menor frequência na medicina veterinária (Fleming e Ettinger, 2019).

Já na HP secundária ao aumento da pressão do átrio esquerdo, também chamada de HP pós-capilar (ou venosa), é caracterizada pela congestão venosa e pode se agravar à medida que se torna crônica (Reinero et al, 2020). Isso acontece porque a circulação pulmonar é um sistema fisiológico de baixa pressão, baixa resistência e alta capacitância, logo, à medida em que ocorre congestão venosa, substâncias reguladoras da vasoconstrição e vasodilatação são liberadas, num processo adaptativo, para a pressão arterial voltar a ser maior do que a pressão venosa e consequentemente evitar a congestão venosa e o edema pulmonar (Fleming e Ettinger, 2019; Kellihan e Stepien et al. 2012).

Entretanto, cronicamente, os mediadores vasoativos promovem proliferação da camada íntima, hipertrofia da camada média e trombose, tal fase é caracterizada por HP pré e pós-capilar combinada (Kellihan e Stepien et al. 2012; Reiner et al, 2020). Em cães, a doença valvar mitral (DVM) é a causa mais frequente de HP pós-capilar (Poser et al. 2017).

E, por último, no caso de HP por aumento da resistência vascular pulmonar, variadas causas podem estimular a vasoconstrição arterial pulmonar, como doenças pulmonares ou hipóxicas, tromboembolismo pulmonar agudo ou crônico, doenças parasitárias pulmonares ou vasculares pulmonares (Reiner et al, 2020). Uma importante causa de HP é a doença pulmonar intersticial na raça West Highland White Terriers que pode ocorrer de forma primária (Shoover e Baad, 2006).

Vale ressaltar que o ON não atua sozinho na regulação dos vasos sanguíneos e na fisiopatologia da HP, mediadores como a endotelina 1 (ET-1), prostaciclina e tromboxanos são importantes (Tessier-Vetzel et al., 2006). Em seres humanos, está bem consolidado que independentemente do tipo de HP, há uma desregulação dos mediadores vasodilatadores com diminuição na função da eNOS e “desacoplamento” enzimático, diminuição da produção de prostaciclina (disfunção da ciclooxigenase-2) e aumento da expressão e atividade do vasoconstritor e sistema de sinalização mitogênica da ET-1 (Tabima et al., 2012). A superexpressão da ET-1 no tecido pulmonar, assim como o remodelamento dos vasos arteriais pulmonares já foram associados com a presença de HP também em cães, e clinicamente, a ET-1 pode ser usada como um marcador clínico de doenças cardiopulmonares nessa espécie, como demonstrado por Fukumoto et al (2014) que avaliaram cães com insuficiência tricúspide, estimada ecocardiograficamente, maior do 3m/s (Fukumoto et al., 2014).

Independente da causa, a hipertensão pulmonar em cães compromete a função ventricular direita devido ao aumento da pós-carga imposta pelo aumento anormal da pressão na vasculatura pulmonar, podendo levar à disfunção sistólica do ventrículo direito, dilatação das câmaras cardíacas direitas, alterações no fluxo pulmonar, e, consequentemente, sinais clínicos de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) direita, especialmente, em fases mais avançada da HP (Reiner et al., 2020; Braz et al, in press).

O ON no tratamento da HP

Na medicina humana, algumas opções de medicamentos estão disponíveis na tentativa de promover vasodilatação arterial pulmonar diante da HP, como, por exemplo, o ON oriundo da via nitrito-nitrato inorgânico que agem como potentes vasodilatadores na presença de hipoxemia (Chirinos e Zamani, 2016). Outras opções mais comuns em seres humanos são os inibidores da endotelina-1, infusão contínua de prostaciclina e o sildenafil (Barberà et al., 2017). O custo elevado e a acessibilidade dos medicamentos que requerem hospitalização, como por exemplo a infusão contínua de prostaciclina, complicam a aplicabilidade na medicina veterinária.

Em cães, os estudos estão voltados principalmente aos inibidores da fosfodiesterase 5, representados pelo sildenafil e tadalafil (Jaffey et al., 2019). Esses medicamentos atuam inibindo seletivamente a fosfodiesterase 5, enzima responsável pela conversão de GMP em GMPc e, portanto, aumenta a biodisponibilidade de ON endógeno (Kellum e Stepien, 2007). O mecanismo de ação dos inibidores da fosfodiesterase 5 no relaxamento vascular está representado esquematicamente na Figura 2. Acredita-se que o ON além de promover vasodilatação arterial pulmonar em cães, também melhora a capacidade cardíaca e remodelamento vascular, uma vez que reduz a pressão e a resistência vascular em seres humanos (Bach et al., 2006). Além do mais, o sildenafil foi associado à redução do gradiente de pressão da insuficiência tricúspide, ao aumento da tolerância ao exercício e à melhor qualidade de vida em cães tratados durante quatro semanas (Brown et al., 2010). Já o tadalafil, após ensaio clínico em cães, também parece ser bem tolerado e representa atualmente uma nova opção segura para o tratamento da HP em cães (Jaffey et al., 2019).

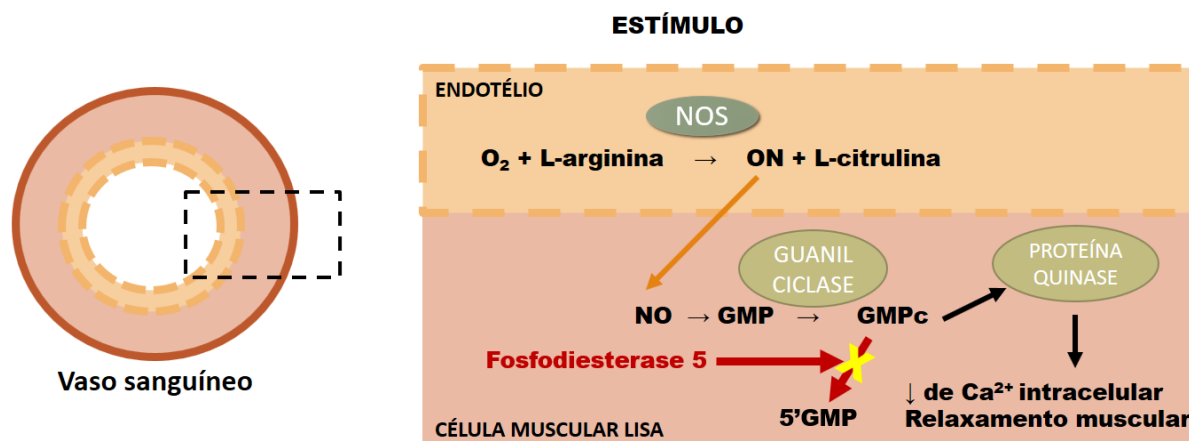


Figura 2: Mecanismo de ação dos inibidores da fosfodiesterase 5 no relaxamento vascular. O estímulo para a produção do óxido nítrico (força de cisalhamento e ligação do cálcio com a calmodulina) ativa a função da NOS que, na presença de oxigênio, converte a L-arginina em L-citrulina e libera o ON. Por difusão, o ON entra na célula muscular lisa e estimula a enzima guanilato ciclase a converter o GMP em GMPc. O GMPc ativa a proteína quinase para o relaxamento muscular mediado pela redução do cálcio intracelular. A fosfodiesterase 5 é a enzima responsável pela conversão do GMPc em 5'GMP e interromper o relaxamento. Por sua vez, os inibidores da fosfodiesterase 5 atuam permitindo um relaxamento vascular prolongado por aumentar a biodisponibilidade do GMPc.

Conclusão

O ON é uma molécula instável que está envolvida em muitas atividades fisiológicas e patológicas no organismo, fato que tem inspirado vários estudos desde a sua descoberta em 1980. Relativamente, é uma molécula de reconhecimento recente, então, ainda nos tempos atuais, muitos estudos sobre o ON estão sendo conduzidos em diversas áreas com o objetivo de esclarecer os mecanismos atuação, bem como, opções relacionadas ao tratamento de diversas patologias na medicina humana e medicina veterinária. Como no caso da HP em cães, síndrome que tem sido alvo de constantes estudos, mas pouco ainda se sabe sobre sua fisiopatologia em cães, e especialmente sobre a atuação do NO. Sabe-se que, a biodisponibilidade do ON pode influenciar de diferentes formas nas patologias, podendo ter um efeito

maléfico, considerando a formação de radicais livres, como o peróxido de oxigênio, ou ainda a baixa biodisponibilidade na HP em seres humanos. Entretanto, tem se observado os benefícios do uso de medicamentos que aumentam a biodisponibilidade do ON em cães com HP, mostrando que seu efeito vasodilatador influencia a qualidade de vida dos pacientes tratados.

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, Reinero 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, Punihaole 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, Monacoli 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.

CAPÍTULO 2 - Óxido nítrico plasmático em cães com hipertensão pulmonar secundária ou não à doença cardíaca esquerda

Resumo - O óxido nítrico (ON) é um importante vasodilatador na hipertensão pulmonar (HP) em seres humanos. Baseado na literatura humana, sugere-se que em cães também ocorra a diminuição da produção de ON no tecido pulmonar na presença de HP frente à hipóxia, desta forma, o objetivo dessa pesquisa foi determinar a concentração indireta do ON plasmático em cães com HP secundária ou não à doença do lado esquerdo do coração (LHD) e também caracterizar os achados ecocardiográficos de diagnóstico e probabilidade de HP (baixa, intermediária e alta). Para isso, foram coletadas amostras de sangue de 35 cães com probabilidade de HP e o ON foi mensurado por meio da técnica de quimioluminescência. A concentração do ON foi estimada pela concentração de nitrito/nitrato e esta foi significativamente diferente ($p=0,002$) nos cães com HP secundária à LHD (mediana= $14\mu\text{M}$, intervalo 11,19-16,59) e não secundária à LHD (mediana= $25,88\mu\text{M}$, intervalo 15,08-36,71), porém, não significativo para a probabilidade de HP baixa, intermediária e alta, embora houvesse uma tendência a ser maior a concentração de ON nos cães com probabilidade alta. Os resultados desse estudo demonstram que há liberação do ON em cães com HP, bem como, que sua dosagem conseguiu diferenciar cães com HP secundária à LHD de cães com HP não secundária.

Palavras-chave: hipóxia, nitrato, nitrito, pressão arterial pulmonar, vasculatura pulmonar

Abstract - Plasma nitric oxide in dogs with pulmonary hypertension secondary or not to left-sided heart disease

Nitric oxide (NO) is an important mediator responsible for vasodilation in pulmonary hypertension (PH) in humans. Based on human literature, it is suggested that in dogs there is also NO production decrease in lung tissue in the presence of PH with hypoxia, therefore, the aim of this research was to the indirect plasmatic NO concentration in dogs with PH secondary or not to the left-side heart disease (LHD) and also with low, intermediate and high probability of PH to characterize the NO involvement on PH in dogs. Blood samples were collected from 35 dogs with probability of PH and NO was measured using the NO–ozone chemiluminescence method. NO concentration was estimated by the nitrite/nitrate concentration and it was significantly different ($p=0.002$) in dogs with PH secondary to LHD (median=14 μM , range 11.19-16.59) and not secondary to LHD (median=25.88 μM , range 15.08-36.71), however, not significant for the probability of low, intermediate and high PH, although there was a tendency for NO concentration to be higher in dogs with high PH. The results of this study demonstrate that there is release of NO in dogs with PH, as well as that its dosage could differentiate dogs with PH secondary to LHD from dogs with PH nor secondary.

Keywords: hypoxia, nitrate, nitrite, pulmonary arterial pressure, pulmonary vasculature

Introduction

Nitric oxide (NO) is a molecule discovered in 1980 as responsible for vascular relaxation induced by acetylcholine and at that time it became known as the endothelium-derived relaxing factor (Furchgott and Zawadzki, 1980; Palmer *et al.*, 1987). Several cells synthesize NO from arginine through nitric oxide synthase (NOS) which is presented in three isoforms, two constitutive (cNOS) and one induced (iNOS) (Cerqueira and Yoshida, 2002). NO acts physiologically as a messenger in the main systems of the organism, a key determinant of endothelial function with endocrine, autocrine and paracrine action in the heart, in addition to affecting the nervous and immune systems (Levine *et al.*, 2012).

In blood vessels, NO plays a role in regulating the diameter of blood vessels and in vascular resistance by the ability to relax vascular smooth muscle (Levine *et al.*, 2012). In addition, there is a relationship with arterial thrombosis when this gas is reduced (Cerqueira and Yoshida, 2002). When diluted, NO has a half-life of less than 10 seconds due to its rapid oxidation to nitrite and nitrate, therefore it is difficult to measure NO directly and to use such measurements to estimate the overall NO turnover in the body. NO binds to hemoglobin and other proteins that contain the heme nucleus leading to the end of its biological activity (Flora Filho and Zilberstein, 2000). Thus, NO production can be determined by measuring its metabolites in plasma, as well as the activity of endothelial NOS (eNOS) (Kleinbongard *et al.*, 2003).

NO acts physiologically on the heart to adjust cardiac function through actions on inotropism, excitation-contraction coupling, diastolic function, heart rate and beta-adrenergic responsiveness. However, it is known that the activity of the eNOS and iNOS (induced) isoforms is altered during human heart failure (Cotton *et al.*, 2002). The reduction of NO bioavailability is considered to be one of the common central factors in cardiovascular diseases in humans, although it is not clear whether this is the cause or the result of endothelial dysfunction (Naseem, 2005). Dogs with myxomatous mitral valve disease (MMVD) and dilated cardiomyopathy demonstrated an increase in plasma nitrite and nitrate, but it did not correlate with medication use, heart disease severity or TNF- α and IL-1 activity, indicating the need for more research involving NO activity in dogs with heart disease (Laforcard *et al.*, 2003).

NO is also known to be involved in the pathophysiology of pulmonary arterial hypertension (PAH) in humans (Chester *et al.*, 2017). In dogs, pulmonary hypertension (PH) can develop mainly by three reasons: 1) secondary to pulmonary hyperflow, caused by congenital diseases with intra or extra cardiac defects with left-to-right shunt; 2) due to the increase in pulmonary vascular resistance (PVR), secondary to endothelial dysfunction derived from impairment in the pathway of prostacyclins and NO and also to diseases that cause lung parenchyma destruction; and 3) due to increased pulmonary venous pressure, secondary to diseases on the left side of the heart (LHD) (Reinero *et al.*, 2020). Pulmonary hypertension is a multifactorial syndrome whose common result of all underlying causes is increased pulmonary vasculature resistance (Tabima *et al.*, 2012). This resistance results from the vasoconstriction and the endothelial cell proliferation leading to obstructive pulmonary disease, which is mediated by the imbalance in homeostasis between vasoconstrictor (endothelin-1 and thromboxanes A₂) and vasodilators (prostaglandin I₂ and NO) agents, which favors vasoconstriction (Tabima *et al.*, 2012).

The bioavailability of NO increases in inflammatory lung diseases, while it seems to be reduced in PAH in humans, which culminates in endothelial dysfunction, but, apparent controversies about the bioavailability of NO being normal or increased have also been reported, and they could be justified by methodological divergences, such as the selection of patients at different stages or severity of PH, or even by the higher activity of L-arginase II, an enzyme that competes with NOS and reduces the bioavailability of NO (Dias-Junior *et al.*, 2018). On the other hand, there are no detailed studies that investigated the bioavailability of NO in dogs with PH, most studies involving NO in dogs with PH are related to the use of drugs as a source of NO for the treatment of PH (Bueno *et al.*, 2013; Macdonald *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2010; Jaffey *et al.*, 2019). Given the importance of NO in the physiology of pulmonary circulation and involvement in the pathophysiology of PH, this molecule could represent a PH biomarker in dogs. Thus, the aim of this study was to determine the indirect plasma NO concentration in dogs with PH secondary or not to LHD, its stability over time (T1 and T2) and to point out the echocardiographic findings of diagnosis and characterization of the probability of PH.

Materials and methods

Animals

The prospective study was carried out at the Veterinary Hospital of Universidade Estadual Paulista evaluating dogs of clients with suspected PH. The domiciled animals were attended by the cardiology service of the Veterinary Hospital of São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal campus, from January 2017 to December 2019 with suspected PH (ethics committee protocol nº 010488/18). The animals screened with suspected PH were evaluated and classified according to the probability of PH (Reinero *et al.*, 2020) and it was identified whether the cause was secondary to LHD or not. Patients were diagnosed and treated according to the individual clinical need, as well as the returns that were scheduled. In the first evaluation, the guardians of dogs with suspected PH were invited to participate in the study and authorization was requested to collect a blood sample for the measurement of nitrite/nitrato before treatment (when it was needed) (T1). The owners of patients with suspected PH who attended the scheduled return (according to the needs of each patient) were again asked to consent to the collection of a second blood sample (T2) for the measurement of nitrite/nitrate.

Altogether, 72 animals were identified with suspected PH during the study period, which covered 20 months. Nitric oxide was estimated in 42 dogs that had PH and three were excluded because they did not meet the inclusion criteria. From the 42 animals with PH and with measured NO, 7 outliers were identified using the boxplot and were later excluded from this analysis. Thus, 35 animals with PH and whose NO was measured remained in the study. In a second step, from these 72 animals at the beginning of the study, 24 attended the return visit and the NO was dosed again in 11 animals.

Inclusion criteria

Dogs should allow physical examination, blood collection, complete echocardiography examination with standard images for the echocardiographic

diagnosis of PH. Animals should have tricuspid insufficiency, measurable or not, and/or morphological changes in the right ventricle or pulmonary artery, as recommended by the PH consensus in dogs (Reinero *et al.*, 2020) to determine the probability of PH. The echocardiographic signs that define the probability of PH include interventricular septum (IVS) flattening, left ventricular (LV) pseudohypertrophy, right ventricular free wall (RVFW) thickening (hypertrophy) or right ventricular (RV) dilation, pulmonary artery dilation assessed by the ratio with the aortic diameter ($AP/Ao > 1$), pulmonary regurgitation velocity (PR) > 2.5 m/s, right pulmonary artery distensibility (RPAD) index $< 30\%$, pulmonary flow acceleration time (AT) $< 52-58$ ms or low AT ratio in relation to the ejection time (ET) of the pulmonary flow ($AT/ET < 0.30$) and notching in the deceleration of pulmonary flow. The low probability of PH comprised dogs with tricuspid regurgitation velocity (TR) ≤ 3 m/s or not measurable and with zero or one echocardiographic finding. The intermediate probability of PH comprised dogs with TR ≤ 3 m/s or not measurable with two echocardiographic findings, TR between 3.0-3.4 m/s with zero or one echocardiographic finding, or > 3.4 m/s with no echocardiographic finding. The high probability of PH included dogs with TR ≤ 3 m/s or not measurable with three echocardiographic findings, TR between 3.0-3.4 m/s with ≥ 2 echocardiographic findings, or TR > 3.4 m/s with ≥ 1 echocardiographic finding.

Exclusion criteria

Animals that did not meet the criteria for diagnosing the probability and classification of PH were excluded, dogs that did not have blood collection for the NO measurement allowed by the guardian or that the blood sample was not of adequate quality, and if the patients had RV outflow obstruction or congenital heart shunt. Patients with PH and controlled concomitant diseases were not excluded, except if the concomitant disease was in an acute stage or was the cause of clinical signs at the time of cardiological evaluation. Complete blood counts of the patients were performed, with the approval of the tutors, to check if there was an imbalance in the blood cells that could characterize: anemia or polycythemia; leukocytosis or leukopenia. Such abnormalities could be related to subclinical inflammatory factors, a fact that did not fit the exclusion criteria. Patients who were already being treated for

underlying diseases of PH were not excluded, since dogs with PH secondary to MMVD are usually stage C of congestive heart failure (CHF) (Keene *et al.*, 2019). Nitrite/nitrate outliers identified by the boxplot were later excluded from this analysis.

Echocardiographic evaluation - Classification of pulmonary hypertension as secondary or not to LHD and probability of PH.

Complete echocardiographic evaluation was performed on all animals with suspected PH to identify whether the underlying cause was LHD or not. Dogs were classified as PH secondary to LHD if they had left atrial remodeling, characterized by the left atrium/aorta (LA/Ao) ratio ≥ 1.6 (B2, C or D stage of CHF), according to the guidelines of MMVD (Keene *et al.*, 2019) and not secondary to LHD with LA/Ao ratio ≤ 1.6 (A or B1 stage of CHF). Other variables evaluated were the left ventricular internal diameter in diastole (LVIDDN) and left ventricular internal diameter in systole (LVIDSN) normalized by weight, fractional shortening (FS), ejection fraction (EF), E wave (m/s), A wave (m/s), aortic flow velocity (m/s), mitral E' (m/s), mitral E/E', variables indicative of left cardiac remodeling and predictive of congestion.

Echocardiography was also used as a tool for the identification of right cardiac remodeling and systolic dysfunction, in addition to changes in the pulmonary artery for assigning the probability of PH according to the PH diagnostic and classification guidelines (Reinero *et al.*, 2020). For this, the variables evaluated in this study were: TR (m/s), PA/Ao, AT/ET, right pulmonary artery distensibility (RPAD) index (%), tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) indexed by weight ($\text{mm/kg}^{0.284}$), right ventricular internal length in diastole (RVILD) indexed by weight ($\text{mm/kg}^{0.33}$), right ventricular internal length in systole (RVILS) indexed by weight ($\text{mm/kg}^{0.33}$), apical right ventricular internal diameter in diastole (RVIDD_apical) indexed by weight ($\text{mm/kg}^{0.33}$), longitudinal right ventricular internal diameter in diastole (RVIDD_long) indexed by weight ($\text{mm/kg}^{0.33}$), right ventricular area in diastole (RVAD) indexed by weight ($\text{cm}^2/\text{kg}^{0.62}$), right atrial high indexed by weight ($\text{mm/kg}^{0.33}$), right atrial area (RAA) indexed by weight ($\text{cm}^2/\text{kg}^{0.71}$), right ventricular free wall in diastole and left ventricular free wall in diastole ratio (RVFWD/LVFWD), longitudinal right ventricular internal diameter in diastole and left ventricular internal diameter in diastole ratio (RVIDD/LVIDD).

Nitrite/nitrate measurement

NO was estimated using the indirect method of nitrate measurement from venous blood samples, as described by Stabile et al. (2016), collected in tubes containing 0.5 mL of heparin (10 U/mL) and kept in polystyrene boxes with ice until reaching the laboratory or stored in the refrigerator until the time of centrifugation. The samples were centrifuged in refrigerated centrifuges at 4°C, 1200 g, for 20 minutes, and then the plasma was stored in microtubes and kept frozen at -80°C. For the measurement of nitrate, the samples were thawed and aliquots of 25.0 µL of plasma were extracted, which were deproteinized by incubation with absolute ethanol at 4°C and kept for 30 minutes in a freezer (-20°C). Then, they were subjected to centrifugation (4000 g, 25°C, 10 minutes) for later measurement. NO–ozone chemiluminescence method was used for the measurement of plasma nitrate using the Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA). Through this technique, there is a reaction that produces NO₂ and emits an amount of photons that is proportional to the concentration of NO (Ricciardolo, 2003).

Statistical analysis

The results are expressed as the mean $\pm$ SEM or median and interquartile range. To test the normality of data, the Shapiro-wilk test was used, and for the homogeneity of variance, the Bartlett test was used.

For data with normal distribution, the ANOVA test and subsequent Tukey test were used. For data without normal distribution, the Kruskal-Wallis test and subsequent Dunn test were used to compare the echocardiographic variables and the value of NO in the PH not secondary to LHD and PH secondary to LHD and among the groups with low, intermediate and high PH probability.

To compare the NO value between time T1 and T2, the paired sample t-test or the Wilcoxon signed rank test was used.

Statistical analyses were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Clinical variables

This study evaluated 35 dogs with probability of PH. The analysis of age, weight and sex were not significant for groups with PH secondary or not to LHD, while age was higher in dogs with intermediate probability of PH. The clinical variables are described in Tab. 1 and 2.

Table 1. Baseline data of clinical and echocardiographic variables of left heart side, right ventricle and pulmonary artery from 35 dogs with pulmonary hypertension secondary or not to left heart disease.

Clinical variables	PH not secondary to LHD	PH secondary to LHD	P value*
N cases	17	18	
Sex (male/female)	6/12	9/8	0.400
Age (years)	11 (10-13)	12 (11-13)	0.200
BW (kg)	7.4 (4.6-9.8)	8.6 (4.5-14)	0.488
NO (μ M)	14 (11.19-16.59)	25.88 (15.08-36.71)	0.002

*P< 0.05. BW, body weight; NO, nitric oxide.

Table 2. Baseline data of clinical and echocardiographic variables of left heart side, right ventricle and pulmonary artery from 35 dogs grouped based on probability of pulmonary hypertension

Clinical variables	Low probability	Intermediate probability	High probability	P value
N cases	12	9	14	
Sex (male/female)	5/7	4/5	6/8	1
Age (years)	13 (8.75-12) ^b	13 (12.75-15.25) ^a	12 (10.25-13) ^{ab}	0.011
BW (kg)	8.75 (5.10-10.55)	7.40 (4-10.8)	7 (4.78-14.33)	0.835
NO (μ M)	13.51 (12.35-25.85)	15.91 (15.22-19.02)	18.94 (14.25-29.08)	0.380

Different letters indicate significant differences (P< 0.05) among groups. BW, body weight; NO, nitric oxide.

The results of complete blood counts of animals with NO measured were analyzed individually for the presence of anemia/polycythemia or leukocytosis/leukopenia. Not all patients had exams on the day of NO collection, since it also depended on the tutor's authorization. 7/10 animals had a complete blood count on the day of diagnosis (T1), and only 2/7 had anemia. One of them was a female, Shih Tzu, 13 years old, with PH secondary to heart disease and high probability of PH (red blood cells 4,650,000/ μ L; NO = 14.27/ μ M) and which, in addition to anemia, also presented thrombocytosis, eosinopenia, lymphopenia and characteristics such as targeted red blood cells, mild anisocytosis, toxic neutrophils and atypical lymphocytes. The second animal with anemia (4,110,000/ μ L; NO = 73.78/ μ M) was a male, Poodle, 13 years old, with PH secondary to heart disease and high probability of PH. It also had mild leukocytosis (18,900/ μ L) due to neutrophilia, with the presence of mild anisocytosis and poikilocytosis. Still at T1, one female, Pinscher, 12 years old with low probability of PH not secondary to LHD, presented leukopenia (3,200/ μ L; NO = 14.72/ μ M) due to neutropenia and lymphopenia. At T2, 5/10 animals had blood count on the day of NO measurement, none of them had anemia, 2/5 had leukopenia, since one animal was the before mentioned female, Shih Tzu, 13 years old, with PH secondary to heart disease and high probability of PH (total leukocytes 5,800/ μ L; NO = 21.55/ μ M) due to lymphopenia and the other was a female, 13 years old Poodle (5,500/ μ L; NO = 12.55/ μ M) also due to lymphopenia.

Variables for identifying PH secondary to LHD and not secondary to LHD

The echocardiographic parameters LVIDDN, LVIDSN, LA/Ao, E wave, A wave, aortic flow velocity, mitral E', mitral E/E', related to left heart function and morphology, were efficient in differentiating patients with PH secondary to LHD and not secondary to LHD. The variables FS and EF presented no statistical difference. The data are shown in Tab. 3. Regarding the identification of dogs with low, intermediate and high probability of PH, the echocardiographic parameters LVIDDN, LVIDSN, LA/Ao, E wave, A wave, aortic flow velocity, mitral E', mitral E/E', FS and EF were not significant (Tab. 4).

Nitrates and Nitrites

Plasma nitrate was able to differentiate dogs with PH secondary to LHD from dogs with PH not secondary to LHD (Tab. 1); however, it was not significant to differentiate the low, intermediate and high probability of PH in dogs (Tab. 2).

Table 3. Baseline data of echocardiographic variables of left heart side, right ventricle and pulmonary artery from 35 dogs with pulmonary hypertension secondary or no to left heart disease.

	PH not secondary to LHD	PH secondary to LHD	P value*
Echocardiographic left heart variables			
LVIDDN	1.6 (1.33-1.53)	1.82 (1.6-2.17)	0.003
LVIDSN	0.77 (0.68-0.85)	0.9 (0.73-1.14)	0.033
EF (%)	78.62 ± 7.42	78.99 ± 7.36	0.886
FS (%)	46.24 ± 8.02	47.17 ± 6.93	0.717
LA/Ao ratio	1.51 (1.29-1.66)	2.16 (1.75-2.42)	0.000
E (m/s)	0.7 ± 0.19	1.23 ± 0.3	0.000
A (m/s)	0.77 ± 0.28	1.09 ± 0.24	0.002
E/A	0.755 (0.755-1.105)	1.08 (0.805-1.505)	0.171
Aortic flow velocity (m/s)	1.08 ± 0.26	1.31 ± 0.26	0.021
S' mitral (m/s)	0.94 ± 0.32	1.1 ± 0.32	0.171
E' mitral (m/s)	0.62 ± 0.17	0.95 ± 0.27	0.000
E/E' mitral	1.09 (1.07-1.22)	1.41 (1.15-1.72)	0.050
Echocardiographic right ventricle and pulmonary artery variables			
TR (m/s)	2.99 (0.46)	2.89 (0.68)	0.642
PA/Ao ratio	0.92 (0.82-0.99)	1.04 (0.94-1.17)	0.027
AT/ET (pulm flow)	0.45 (0.12)	0.36 (0.11)	0.031
RPAD Index	34.14 (9.93)	30.46 (12.36)	0.344
TAPSE (mm/kg ^{0.284})	6.93 (2.13)	6.74 (1.74)	0.782
RVILD/kg ^{0.33}	11.31 (2.63)	13.03 (2.45)	0.054
RVILS/kg ^{0.33}	8.58 (2.02)	11.19 (2.38)	0.001
RVIDD_apical/kg ^{0.33}	8.07 (2.2)	8.62 (2.67)	0.504
RVIDD_long/kg ^{0.33}	5.01 (4.28-5.97)	4.78 (3.68-6.93)	0.895
RVAD (cm ² /kg ^{0.62})	0.72 (0.63-1.02)	0.93 (0.65-1.03)	0.448
RA high/kg ^{0.33}	9.5 (1.81)	10.57 (2.6)	0.165
RAA (cm ² /kg ^{0.71})	0.66 (0.57-0.81)	0.95 (0.57-1.10)	0.269
RVFWD/LVFWD	0.77 (0.18)	0.85 (0.16)	0.155
RVIDD/LVIDD_long	0.44 (0.34-0.52)	0.3 (0.24-0.38)	0.009

*P< 0.05. TR, tricuspid regurgitation; PA, pulmonary artery; Ao, aorta; AT, acceleration time; ET, ejection time; RPAD index, right pulmonary artery distensibility index; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; RVILD, right ventricle internal length in diastole; RVILS, right ventricle internal length in systole; RVIDD, right ventricle internal length in diastole; RVAD, right ventricle area in diastole; RA, right atrium; RAA, right atrium area; RVFWD, right ventricle free wall in diastole; LVFWD, left ventricle free wall in diastole; RVIDD_long, longitudinal right ventricle internal diameter in diastole; LVIDD_long, longitudinal left ventricle internal diameter in diastole.

Table 4. Baseline data of echocardiographic variables of left heart side, right ventricle and pulmonary artery from 35 dogs grouped based on probability of pulmonary hypertension

Echocardiographic left heart variables				
	Low probability	Intermediate probability	High probability	P value
LVIDDN	1.57 (0.29)	1.7 (0.48)	1.7 (0.41)	0.647
LVIDSN	0.84 (0.77-0.9)	0.85 (0.69-1.12)	0.74 (0.65-1.03)	0.930
EF (%)	78.6 (76.38-80.21)	77.14 (72.50-83.17)	80.27 (71.85-86.96)	0.876
FS (%)	45.78 (4.53)	45.42 (7.3)	48.3 (9.43)	0.588
LA/Ao ratio	1.66 (0.43)	1.86 (0.46)	1.98 (0.53)	0.293
E (m/s)	0.82 (0.35)	1.06 (0.31)	1.11 (0.53)	0.255
A (m/s)	0.86 (0.35)	1.05 (0.31)	0.92 (0.26)	0.401
E/A	0.92 (0.8-0.9)	0.77 (0.72-0.9)	0.93 (0.79-1.45)	0.269
Aortic flow velocity (m/s)	1.13 (0.36)	1.26 (0.14)	1.22 (0.25)	0.641
S' mitral (m/s)	0.9 (0.34)	1.08 (0.27)	1.15 (0.23)	0.132
E' mitral (m/s)	0.6 (0.18)	0.79 (0.13)	0.74 (0.18)	0.063
E/E' mitral	1.22 (1.07-1.54)	1.14 (1.09-1.38)	1.26 (1.1-1.68)	0.719
Echocardiographic right ventricle and pulmonary artery variables				
TR (m/s)	2.51 (0.33) ^b	2.93 (0.48) ^{ab}	3.27 (0.58) ^a	0.004
PA/Ao ratio	0.95 (0.83-1)	0.93 (0.87-1)	1.07 (0.93-1.22)	0.145
AT/ET (pulm flow)	0.43 (0.1) ^a	0.47 (0.12) ^{ab}	0.34 (0.11) ^b	0.023
RPAD Index	36.95 (9.08)	33.02 (11.38)	28.16 (11.64)	0.130
TAPSE (mm/kg ^{0.284})	6.28 (1.9)	7.02 (1.89)	7.2 (2)	0.465
RVILD/kg ^{0.33}	12.62 (2.49)	11.12 (2.56)	12.72 (2.75)	0.263
RVILS/kg ^{0.33}	10.05 (1.96)	8.77 (2.32)	10.63 (2.87)	0.172
RVIDD_apical/kg ^{0.33}	6.68 (1.84) ^b	8.39 (2.41) ^{ab}	9.36 (2.29) ^a	0.029
RVIDD_long/kg ^{0.33}	4.42 (1.33) ^b	4.28 (1.14) ^b	6.35 (1.74) ^a	0.002
RVAD (cm ² /kg ^{0.62})	0.72 (0.63-0.94)	0.7 (0.64-1.00)	1.03 (0.67-1.47)	0.168

RA high/kg ^{0.33}	9.41 (1.73) ^{ab}	8.8 (1.67) ^b	11.45 (2.3) ^a	0.005
RAA (cm ² /kg ^{0.71})	0.62 (0.52-0.69) ^b	0.58 (0.51-1.10) ^{ab}	0.97 (0.74-1.27) ^a	0.025
RVFWD/LVFWD	0.7 (0.16) ^b	0.86 (0.17) ^{ab}	0.87 (0.15) ^a	0.025
RVIDD/LVIDD_long	0.35 (0.15) ^{ab}	0.24 (0.11) ^b	0.5 (0.12) ^a	0.024

Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among groups. TR, tricuspid regurgitation; PA, pulmonary artery; Ao, aorta; AT, acceleration time; ET, ejection time; RPAD index, right pulmonary artery distensibility index; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion; RVILD, right ventricle internal length in diastole; RVILS, right ventricle internal length in systole; RVIDD, right ventricle internal length in diastole; RVAD, right ventricle area in diastole; RA, right atrium; RAA, right atrium area; RVFWD, right ventricle free wall in diastole; LVFWD, left ventricle free wall in diastole; RVIDD_long, longitudinal right ventricle internal diameter in diastole; LVIDD_long, longitudinal left ventricle internal diameter in diastole.

The time of the first evaluation and the second evaluation was variable among the animals because they obeyed a return deemed necessary according to the clinical need of each patient, with a minimum time of 28 days in symptomatic patients and a maximum of 308 days in asymptomatic (for example, CHF stage B2 dogs), with an average of 102.2 days for the 11 dogs that returned and had their NO measured in the second time to evaluate his stability. The statistical test showed that there was no significant difference in the NO in time 1 compared to time 2 (Fig. 1).

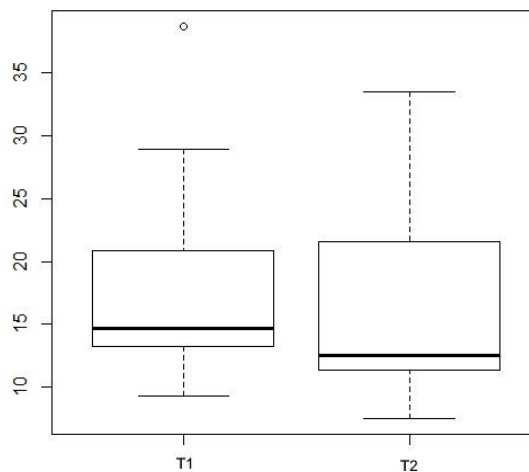


Figure 1. Plasma nitric oxide concentration of 11 dogs with probability of pulmonary hypertension on first (T1) and second (T2) day of collection.

Variables of the right ventricle and pulmonary artery

The variables related to the right side of the heart and the pulmonary artery that were significant to differentiate PH secondary to LHD from PH non-secondary to LHD are: AT/ET, PA/Ao, indexed RVILS and RVIDD/LVIDD ratio. The other variables, such as TR, RPAD index, TAPSE, indexed RVILD ($p=0.0504$), indexed RVIDD_apical, indexed RVIDD_long, RVAD, RV high, RAA and RVFWD/LVFWD ratio were not significant (Tab. 3). However, when the analysis was performed considering the probability of PH, the variables AT/ET, RV high, RAA, TR, indexed RVIDD_apical, indexed RVIDD_long and RVFWD/LVFWD were statistically different (Tab. 4).

Discussion

Studies demonstrate that, in both humans and dogs, the NO concentration appears to be increased in individuals with heart disease (Willaw et al., 1994; Habib et al., 1994; de Laforcade et al., 2003), a fact that was also observed in the results of this present study in which the NO concentration was significantly higher in dogs with pulmonary hypertension secondary to LHD. In fact, the NO concentration was even higher than the values demonstrated in a research that determined baseline NO values in healthy dogs (median=0.00 μ M, range 0.00-6.16 μ M) compared to dogs with spontaneous heart disease (median=4.57 μ M, range 0.00-31.05 μ M, $p=0.04$) (de Laforcade et al., 2003). Similarly, the endothelium-derived relaxing factor (NO) by stimulation of α_2 -adrenergic receptors appears to be selectively increased in the coronary arteries of dogs with experimental CHF. On the other hand, this was not observed in muscular arteries, and the authors suspected it occurred probably because the endothelial vasodilator function represents an important homeostatic mechanism, which in the face of a drop in cardiac output, selectively contributes to the preservation of coronary blood flow (O'Murchu et al., 1994).

Dogs with heart disease and left cardiac remodeling and alterations suggestive of PH evaluated in this study had a higher NO concentration than dogs with PH not secondary to LHD, although both values were above values already categorized for healthy dogs and dogs with heart disease (de Laforcade et al., 2003). The higher

values found in the animals of our study could be explained by the probability of presence of PH that was estimated echocardiographically, as recommended by the guidelines. This differential factor in our study may have contributed to the finding of increased NO concentration in the groups evaluated. This fact probably implied in the absence of a significant difference in NO concentration when compared among the PH probability categories, although the results show a tendency for a higher NO concentration in dogs with a high PH probability.

An important point to be considered in our results is how NO formation occurred in the patients studied. We did not measure NOS, but due to the known inflammatory character of the underlying diseases, both MMVD and respiratory diseases could have a potential to induce iNOS activity (Belder et al., 1993). It has already been demonstrated in chronic CHF in humans that there is a negative regulation of eNOS, which decreases the bioavailability of NO and justifies changes in the endothelium, since eNOS is mainly expressed in the blood vessels endothelial cells (Le Corvoisier et al., 2000; Dias-Junior et al., 2008). Furthermore, cytokines stimulate iNOS, an enzyme that is also found in alveolar macrophages and has expression regulated by inflammatory mediators, that is, it is pro-inflammatory (Belder et al., 1993; Macdonald et al., 1996). This means that the increase in iNOS expression increases NO production, but in this situation, the excess of NO limits the inotropic capacity and exerts pro-apoptotic effects (Le Corvoisier et al., 2000).

However, this direct correlation between inflammatory substances such as TNF and IL-1 with NO has not been confirmed in dogs by de Laforcade et al. (2003). On the other hand, Fahim et al. (2004) demonstrated that cardiac remodeling can increase nitrite, nitrate and TNF alpha concentrations in dogs with dilated cardiomyopathy. Fahim et al. (2004) observed that the concentration of nitrite and nitrate increases not only with the severity of heart failure, but also with the worsening of the left ventricular function, this was demonstrated by a decrease in ejection fraction, and an increase in left ventricular end-systolic and diastolic diameters. Therefore, cardiac remodeling may be a factor that increases the concentration of nitrite/nitrate, as seen in our result of dogs with PH secondary to left heart disease, since it was about elderly patients with chronic heart disease that led to the remodeling of the left heart to the point of culminating in suspected PH.

Since MMVD has been associated with endothelial dysfunction, Reimann et al. (2014) studied biopterin (BH4 and BH2) in dogs, an important cofactor for NO production, whose plasma concentration may reflect endothelial dysfunction and oxidative stress. They observed that biopterin was higher in the groups with symptomatic CHF (ACVIM class C) compared to the groups without symptoms (control, ACVIM B1 and B2); therefore, the authors concluded that the cardiac status is associated with the concentration of biopterin (Reimann et al., 2014). Although this study is not exactly the same of measure nitrite/nitrate and also did not clarify whether the dogs had PH, the findings could support our study because of the similarity to characterize a possible endothelial dysfunction, since our dogs with PH secondary to MMVD also presented increased values of nitrite/nitrate and it is related to CHF as seen by de Laforcade *et al.* (2003) and Fahim et al. (2004).

Different results were found by Pedersen et al. (2003), that measured plasma nitrite and nitrate in dogs with and without mitral regurgitation and concluded that endothelial dysfunction occurs early in the development of mitral regurgitation in dogs (Cavalier King Charles Spaniels), and it was demonstrated as nitrite and nitrate concentrations decreased in animals with moderate to severe mitral regurgitation and no clinical signs (median 11.2 microM; interquartile range 6.9-17.1 microM; $P = 0.02$) compared to control group (median 20.0 microM; interquartile range 15.1-25.5 microM). Analyzing this, it should be taken into account that the LA/Ao ratio was not a classification criterion in the study by Pederson et. al (2003) and that dogs had an LA/Ao ratio ≤ 1.6 . In contrast, our study considered the LA/Ao ratio above 1.6 as a criterion to classify dogs with postcapillary PH and not the filling of the regurgitation in relation to the LA. That is, left cardiac remodeling and PH should be present in these dogs. Maybe, to MMVD, initially there may be endothelial dysfunction with a reduction in NO by eNOS (Le Corvoisier *et al.*, 2000; Dias-Junior *et al.*, 2008) and subsequently, by the activation of inflammatory factors and iNOS activity, NO increases (Belder et al., 1993). This could explain why our results presented higher nitrite and nitrate values in dogs with PH secondary to MMVD and lower in dogs with PH not secondary to MMVD, since in this last group the left cardiac remodeling was not present.

Although there is different information regarding the down-regulation and up-regulation of eNOS in lung tissue, there is a consensus that NO signaling is impaired

in the lungs of humans with PH and the reduction in its bioavailability may be related to impaired production or increased consumption (Tabima *et al.*, 2012; Giaid and Saleh, 1995; Xue and Johns, 1995). These findings were not observed in our study due to two possible explanations, primarily for involving patients with PH secondary to some underlying disease, and not just dogs with primary pulmonary hypertension as is very common in human being. Another possibility is because the formation of NO in the lung tissue itself has not been evaluated, but it has been evaluated in peripheral blood. Unfortunately, we were not able to confirm diagnosis of underlying diseases of dogs with PH not secondary to LHD group, but we presume they had PH because increased pulmonary vascular resistance, since we excluded the possibility of pulmonary hyperflow.

Still considering that the formation of NO can occur because of an inflammatory stimulus, the complete blood counts of dogs with NO measured were analyzed individually at T1 and T2, searching for imbalance in blood cells, especially related to red blood cells and total leukocytes. However, we could not have evaluated if there was direct relationship with the presence of anemia or polycythemia, leukocytosis or leukopenia with the NO values obtained, since few dogs had this kind of variation, but that dogs there was no pattern of increase or decrease in the NO value in the presence of changes in the complete blood count at individually comparison. Nevertheless, we consider that further investigation of the agents involved in more specific inflammatory processes in the body, such as TNF alpha and interleukins (de Laforcade *et al.*, 2003; Fahim *et al.* 2004), may be targets of future research involving dogs with PH, since it was not included in the objectives of this study.

In order to understand the role of nitric oxide in PH in dogs, it is necessary to comprehend the process of establishment and development of PH in this species, which is not yet fully elucidated, although the consensus published by Reinero *et al.* (2020) guide future studies. It is known that physiologically there is a delicate and precise regulation in the balance between vasoconstrictor and vasodilator molecules and that, in PH, this balance is out of adjustment and favors vasoconstriction (Tabima *et al.*, 2012). However, after the ACVIM consensus (Keene *et al.*, 2019), Reinero *et al.* (2020) published the PH guidelines that defined that the increase in pulmonary arterial pressure (PAP) in dogs may not originally start with the increase in PVR in several

situations, such as in increased cardiac output, left-to-right shunts and increased capillary pressure secondary to LHD. Likewise, the increase in PAP can also occur due to increased PVR or by situations such as pulmonary vascular injury secondary to several causes. Thus, it was recommended by the consensus that the increase in PAP associated with the increase in capillary pressure, determined echocardiographically by the increase in pressure in the left atrium (LA), is called post-capillary PH. The increase in PAP associated with the increase in PVR without increasing LA pressure, is called pre-capillary PH. And it was also well delineated that an increase in PVR can develop in cases of PH secondary to chronic LHD, being called combined pre and post capillary PH (Reinero *et al*, 2020).

In view of such variety in the definition and classification of PH and considering that the most frequent disease in the clinical routine of the veterinary hospital where this research was developed is MMVD, we chose in this study to simplify the classification of the evaluated dogs. It was based only on the characterization of clinical signs and echocardiographic findings that are known to characterize left cardiac remodeling and possible presence or absence of venous congestion to determine dogs with PH secondary to LHD. Thus, dogs with suspected PH and which did not meet the LHD criterion were classified into dogs with PH not secondary to LHD. In the same way that it was presented in this study, the results showed that the dogs showed differences when comparing echocardiographic parameters of evaluation on the left side. The LA/Ao ratio and the LVIDDN were the most important to characterize the left cardiac remodeling and the E wave and aortic flow velocity to characterize signs of increased preload (Keene *et al.*, 2019). This information is relevant to demonstrate that there is a difference in the underlying cause of PH in the dogs evaluated and to justify the possible process of establishing PH in a chronic and slow way in both groups and that in these patients the plasma NO concentration will be able to differentiate dogs with pre-capillary and post-capillary PH.

Analyzing the echocardiographic data and the NO concentration more broadly, it was observed that some echocardiographic variables were more efficient in association with NO in characterizing patients with PH secondary or not to LHD. The variables AT/ET and PA/Ao are indicative of changes in the pulmonary artery, of accelerated pulmonary flow and pulmonary trunk dilation. Both when increased are

indicative of suspected PH (Reinero *et al.*, 2020) and proved to be important tools for identifying dogs with suspected PH in this study. RV dilation and hypertrophy are also indicative of suspected PH, according to the consensus published by Reinero *et al.* (2020), nevertheless, the consensus did not make it clear which measures can be used for such inference. In the present study, the variables indexed RVILS and RVIDD/LVIDD indicate RV dilation and hypertrophy, respectively, and were important for identifying the probability of PH in the dogs evaluated.

Regarding the echocardiographic criteria recommended by the PH consensus (Reinero *et al.*, 2020) to characterize the probability of PH, our study showed that NO was not correlated with these variables that could be indicative of RV remodeling and/or dysfunction and alteration of the pulmonary artery (data not shown). Although the result showed a tendency for the greater availability of NO the higher the probability of PH, the difference was not significant and we take account the short number of cases evaluated. Despite that, this could be probably due to what has already been discussed about the broad activity of NOS and alternative routes for NO production. In addition, there may also have been an influence of other important mediating factors in the establishment of the pulmonary arterial vasoconstriction process not covered in this research, but also mentioned previously. Among these, endothelin-1 plays a key role in the vasoconstriction process and it has already been demonstrated by Tessier-Vetzel *et al.* (2006) that, in dogs with spontaneous heart disease and respiratory disease, endothelin-1 is increased in relation to healthy dogs and concentration increases as the heart failure class (International Small Animal Cardiac Health Council classification, 1999) and the severity of the lung disorder worsen.

Moreover, another very important result of Tessier-Vetzel *et al.* (2006) study is that endothelin-1 was positively correlated with echocardiographically estimated systolic pulmonary hypertension in these dogs. Given this, it is possible that NO has a similar behavior in the progression of PH, but it was not possible to evidence it in this research due to limitations such as the number of animals selected or also to the non-dosage of other important mediators that can influence the bioavailability of NO and that could elucidate more details the relationship between it in the severity of PH.

This work has some limitations. One of them is the choice of estimation of NO through the measurement of its substrates in blood, plasma nitrite and nitrate. Plasma nitrite and nitrate have a longer half-life and may not represent the actual value over time, however, our study showed that there was no significant variation in these substrates in the second dosage after a period. Another possible limiting factor is that this study evaluated the NO concentration in the bloodstream, which may not represent what happens in the pulmonary vascular bed, as it is well known that there is low availability of NO in the lungs at PH. However, a study that was able to assess the pulmonary concentration of NO or NOS in the lungs of spontaneously domiciled dogs affected by PH would be very difficult to be performed due to the low lung biopsy routine, cost to the owner and anesthetic and surgical risks to the patient. Besides that, there is an ethical issue involved in the use of guardian dogs spontaneously affected by PH as an experimental model.

Conclusion

In the present study, indirect plasma NO was able to differentiate dogs with PH secondary to LHD from dogs with PH not secondary to LHD and the echocardiographic parameters helped to classify this groups. Nevertheless, NO was not significant to differentiate the low, intermediate and high probability of PH in dogs, even though, NO demonstrated a tendency to be increased as higher the probability of PH. In these dogs, the NO remained with a similar value between the first and the second collection, showing that there is stability of this substance in the vascular bed.

References

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.

Cotton JM, Kearney MT, Shah AM (2002) Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? **Heart** 88:564-566.

De Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF, Moncada S (1993) Nitric oxide synthase activities in human myocardium. **Lancet** 341:84-85.

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.

Fahim MR, Halim SM, Kamel I (2004) The role of oxidative products of nitrous oxide and the tumor necrosis factor alpha in dilated cardiomyopathy. **Egyptian Journal of Immunology**. 11(1):39-46.

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.

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

Giaid A, Saleh D (1995) Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **New England Journal of Medicine** 333:214-221.

Habib F, Dutka D, Crossman D, Oakley CM, Cleland JG (1994) Enhanced basal nitric oxide production in heart failure: Another failed counter-regulatory vasodilator mechanism? **Lancet** 344:371–373.

Jaffey JA, Leach SB, Kong LR, Wiggen KE, Bender SB, Reinero 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.

Keene BW, Atkins CE, Bonagura JD (2019) ACVIM consensus guidelines for the diagnosis and treatment of myxomatous mitral valve disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 33:1127-1140.

Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M (2003) Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Radical Biology and Medicine** 35:790-796.

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

Le Corvoisier P, Lopes ME, Su J, Hittinger L (2000) Rôle du monoxyde d'azote dans l'insuffisance cardiaque [Role of nitric oxide in heart failure]. **Journal de la Société de Biologie** 194:143-149.

Macdonald P, Schyvens C, Winlaw D (1996) The role of nitric oxide in heart failure. Potential for pharmacological intervention. **Drugs Aging** 8:452-458.

Naseem KM (2005) The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Molecular Aspects of Medicine** 26:33-65.

O'murchu B, Miller VM, Perrella MA, Burnett Jr JC (1994) Increased production of nitric oxide in coronary arteries during congestive heart failure. **Journal of Clinical Investigation** 93:165-171.

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

Pedersen HD, Schütt T, Søndergaard R, Qvortrup K, Olsen LH, Kristensen AT (2003) Decreased plasma concentration of nitric oxide metabolites in dogs with untreated mitral regurgitation. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 17(2):178-84.

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.

Reimann MJ, Häggström J, Mortensen A, Lykkesfeldt J, Møller JE, Falk T, Olsen LH (2014) Biopterin status in dogs with myxomatous mitral valve disease is associated with disease severity and cardiovascular risk factors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 28(5):1520-6.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G (2004) Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological Reviews** 84:731-65.

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** 52:1970-1986.

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

Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Berenbrink M, Klare JP, Steinhoff HJ, Semmler D, Shiva S, Williams D, Kipar A, Gladwin MT, Schrader J, Kelm M, Cossins AR, Rassaf T (2012) Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. **Circulation** 126:325-34.

Xue C, Johns RA (1995) Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. **New England Journal of Medicine** 333:1642-1644.

Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, Macdonald PS (1994) Increased nitric oxide production in heart failure. **Lancet** 344:373–374.