



## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 – Epidemiologia da Hipertensão Arterial Sistêmica

Segundo o Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares são as primeiras causas de morte no Brasil, atingindo 32,3% da população (1). Pelos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2001, num total de 56.502.000 de óbitos, 30% foram por doenças cardiovasculares (2). No Brasil em 1998, de 929.023 óbitos; 256.333 foram por doenças cardiovasculares (32,43%). No período entre julho de 2000 e junho de 2001, o total de internações pelo Sistema Único de Saúde (SUS), foi de 11.800.155. As doenças cardiovasculares foram responsáveis por 1.143.955 (9,69%) (1).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), uma doença multifatorial, constitui a doença cardiovascular de mais alta prevalência e representa um grande desafio para a saúde pública mundial (2). A HAS é responsável por 35% de todos os eventos cardiovasculares, atingindo cerca de 17 milhões de pessoas em nosso país (1).

Trata-se de uma doença com alta prevalência na população em geral, afetando 20% dos adultos e 50% dos idosos (3). No entanto, por ser uma doença fundamentalmente assintomática, é usualmente não diagnosticada, metade dos hipertensos ignora que o são e apenas uma pequena fração dos tratados está controlada. No Brasil, a estimativa de prevalência da HAS varia de 22,3% a 44%, de acordo com a área estudada (4).

Sem sintomas no seu estágio inicial, a hipertensão é geralmente diagnosticada quando aparecem as complicações do seu longo período sem tratamento, causando grandes perdas em qualidade de vida e aumento da taxa de mortalidade. A grande incidência de mortes prematuras ocasionadas pela HAS decorre de complicações secundárias à doença como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, aumento no volume cardíaco, insuficiência renal e acidente vascular cerebral (5).

Entre os fatores de risco para mortalidade, a hipertensão arterial é responsável por 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana (6). A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da PA (PA), a partir de 115/75 mmHg (7).

Fatores demográficos, como o envelhecimento da população, e fatores sociais, como a pobreza e o processo de aculturação, condicionam uma alta prevalência de hipertensão arterial (8). Dentre os fatores sócio-ambientais envolvidos com uma maior prevalência da HAS, podem-se incluir os hábitos insalubres de vida, como o tabagismo, o sedentarismo, o consumo excessivo de sal e de álcool. Além disso, evidências experimentais têm mostrado que a

atividade física regular reduz os níveis pressóricos de pacientes hipertensos, contribuindo para o decréscimo de morbidade e mortalidade (3).

## 1.2 – Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Sistêmica

A medida da PA é o principal mecanismo utilizado para o estabelecimento do diagnóstico da hipertensão arterial e a avaliação da eficácia do tratamento. Em estudos populacionais, a PA tem relação direta com o risco de morte e de eventos mórbidos. Os limites de PA considerados normais são arbitrários e, na avaliação dos pacientes, deve-se considerar também a presença de fatores de risco, lesões de órgãos-alvo e doenças associadas. A capacidade de se diagnosticar esta doença depende fundamentalmente dos cuidados dispendidos nas medidas da PA. Minimizam-se, assim, os riscos de falsos diagnósticos, tanto da hipertensão arterial quanto da normotensão, e suas repercussões na saúde dos indivíduos e no custo social envolvido.

Os valores que permitem classificar os indivíduos adultos acima de 18 anos, de acordo com os níveis de PA estão na tabela 1.1 (9).

Tabela 1.1 - Classificação da PA de acordo com a medida casual no consultório (> 18 anos)

<b>Classificação*</b>	<b>Pressão Sistólica (mmHg)</b>	<b>Pressão Diastólica (mmHg)</b>
<b>Ótima</b>	<b>&lt; 120</b>	<b>&lt; 80</b>
<b>Normal</b>	<b>&lt; 130</b>	<b>&lt; 85</b>
<b>Limítrofe</b>	<b>130 – 139</b>	<b>85 – 89</b>
<b>Hipertensão Estágio 1</b>	<b>140 – 159</b>	<b>90 – 99</b>
<b>Hipertensão Estágio 2</b>	<b>160 – 179</b>	<b>100 – 109</b>
<b>Hipertensão Estágio 3</b>	<b>≥ 180</b>	<b>≥ 110</b>
<b><i>Hipertensão Sistólica Isolada</i></b>	<b>≥ 140</b>	<b>&lt; 90</b>

\*Quando as pressões sistólica e diastólica de um paciente situam-se em categorias diferentes, a mais elevada deve ser utilizada para classificação da PA.

Muitas são as causas da hipertensão arterial secundária, dentre estas podemos citar as decorrentes de alguma desordem renal, a Síndrome de Cushing e os tumores na hipófise e na adrenal. Outras condições que podem ocasionar hipertensão arterial são: o uso de alguns medicamentos, desordens na glândula tireoideana, alcoolismo, gravidez e disfunção endotelial. No entanto, a etiologia da hipertensão arterial primária permanece obscura.

Existem diversas hipóteses a respeito da patogênese da HAS. O estudo de Goldblatt nos anos 1930, utilizando cachorros como modelos animais, enfatizou o importante papel do rim na origem desta doença. Estas observações originais em cachorros foram elaboradas por Borst e Guyton et al. (10, 11) que sugeriram que a pressão renal seria um sistema regulatório dos volumes de fluido sanguíneo e do débito cardíaco com o objetivo de manter a PA e o fluxo sanguíneo normais através da natriurese. Atualmente, já se sabe que o sistema de controle renal de pressão e volume é dominante na regulação a longo prazo da PA, em virtude de sua grande capacidade de recuperar a PA alterada para seu valor original pelo aumento ou diminuição da excreção de água e eletrólitos em resposta a uma PA elevada ou reduzida (11, 12). Assim, uma hipótese possível é que a HAS crônica se desenvolve se o mecanismo for anormal ou ajustado para um nível de PA aumentado.

Outra hipótese importante é baseada na atividade do sistema nervoso simpático, onde, em indivíduos hipertensos, representa um estado reativo hiperadrenérgico crônico (13). Existem diversas evidências para uma atividade simpática elevada na hipertensão primária (essencial) humana e experimental. O sistema nervoso simpático pode agir através do rim para causar ou manter a HAS (12). Evidências recentes para o aumento da atividade simpática em ratos espontaneamente hipertensos (SHR - *spontaneously hypertensive rats*) em relação ao WKY incluem: concentrações de noradrenalina e atividade da tirosina hidroxilase elevadas em músculo esquelético e tecido adiposo branco (14), excitabilidade elevada em células do gânglio cervical superior (15) e aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina (14). Os estudos de hipertensão essencial em humanos também indicam um grande aumento da atividade simpática. Assim, a descarga noradrenérgica cardíaca (16) e a atividade simpática muscular (13) encontram-se elevados em pacientes com hipertensão essencial, quando comparados com controles normotensos. Além disso, o papel modulatório do sistema nervoso simpático na hipertensão humana é evidente a partir dos efeitos anti-hipertensivos bem conhecidos de vários tipos de tratamentos que bloqueiam a atividade simpática tanto central quanto periférica.

Por outro lado, a hipertensão em humanos pode se desenvolver em condições onde o tônus simpático encontra-se bastante reduzido. Assim, em um estudo populacional com 117 pacientes com falência autonômica, mais de 50% apresentavam hipertensão supina (17). Um estudo recente (18) mostrou que em adultos humanos nascidos abaixo do peso normal, um grupo com uma alta prevalência de HAS, a atividade simpática neural em repouso era menor que em indivíduos nascidos com peso normal.

A última hipótese importante considera a microcirculação como a principal causa da hipertensão e de suas manifestações iniciais nas doenças cardiovasculares (19, 20).

### 1.3 – Microcirculação

A microcirculação engloba os vasos com diâmetros menores que 100-150  $\mu\text{m}$ , incluindo as arteríolas, os capilares e as vênulas. Entretanto, não há uma definição universal da microcirculação e, não está claro, até que ponto vasos que deveriam ser definidos como pequenas artérias com bases nos critérios anatômicos, porém com diâmetros superiores a 150  $\mu\text{m}$ , devem ser incluídos. Uma outra definição baseada na fisiologia dos vasos arteriais também pode ser proposta, dependendo da resposta do vaso isolado ao aumento da pressão interna. De acordo com esta definição, todos os vasos arteriais que respondem ao aumento da pressão com a diminuição miogênica do diâmetro da luz deveriam ser incluídos na microcirculação, assim como os capilares e as vênulas. Tal definição deveria incluir as pequenas artérias e arteríolas na microcirculação e estaria de acordo com a recente sugestão que os componentes das pequenas artérias e das arteríolas devem ser considerados em continuidade ao invés de sítios distintos do controle da resistência (21, 22).

A microcirculação é responsável pelo transporte de nutrientes para os tecidos e pela remoção dos produtos de excreção celulares. As pequenas arteríolas controlam o fluxo sanguíneo para cada área de tecido e, por sua vez, as condições locais dos tecidos controlam o diâmetro das arteríolas. Em geral, cada artéria nutridora que entra em um órgão ramifica-se por seis a oito vezes antes que as artérias se tornem suficientemente pequenas para serem chamadas de arteríolas, as quais geralmente têm diâmetros internos menores que 20  $\mu\text{m}$ . Então as próprias ramificam-se por duas a cinco vezes, alcançando diâmetros de 5 a 9  $\mu\text{m}$  em suas extremidades, onde suprem sangue aos capilares (23).

Uma segunda função importante da microcirculação é evitar grandes variações na pressão hidrostática ao nível dos capilares que podem causar distúrbios nas trocas entre tecido e capilares. Finalmente, é ao nível da microcirculação que ocorre uma queda substancial na pressão hidrostática. Assim, a microcirculação é extremamente importante na determinação da resistência periférica total (19, 22).

Esta propriedade de resistência das pequenas artérias e das arteríolas está intimamente, embora não exclusivamente, relacionada com a prevalência do tônus miogênico nestes vasos (24). O tônus miogênico é uma propriedade intrínseca do músculo liso vascular, que contrai em resposta ao estiramento, independente de mediação neural ou humoral (25). Todas as artérias possuem tônus miogênico e, portanto, se contraem em resposta ao aumento da PA. Quanto menor o calibre do vaso, mais importante é o tônus miogênico (26) e apenas em pequenas artérias e arteríolas (diâmetros de 15 a 300  $\mu\text{m}$ , dependendo da espécie e do órgão) pode provocar diminuição substancial ou até fechamento da luz do vaso em resposta a um aumento da pressão transmural (24).

O tônus miogênico serve para proteger os capilares contra a hipertensão local deletéria (27). Esta proteção tem um resultado imediato: o aumento do tônus miogênico amplifica a resistência arteriolar ao fluxo sanguíneo, levando a um aumento da PA (24).

### 1.3.1 – Capilares

Os capilares são definidos como vasos que variam de 4 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro, os quais possuem paredes compostas exclusivamente de células endoteliais mais ou menos fenestradas de acordo com o órgão e a membrana basal. Geralmente, cada célula endotelial, enrolada na forma de um tubo, compõe um segmento do capilar (28). Os capilares asseguram as trocas de fluidos e metabólitos entre o plasma e os tecidos, uma função que requer uma alta permeabilidade das paredes, com conseqüente alta fragilidade das mesmas. Exceto em leitos vasculares especializados, tais como o glomérulo renal, a pressão capilar sistêmica normal é relativamente baixa (10 a 30 mmHg) (29).

A elevação da pressão capilar sistêmica acima destes níveis pode ter diversos efeitos potencialmente deletérios, dentre estes: (1) edema intersticial, que pode gerar efeitos drásticos no cérebro como exemplificado pela encefalopatia hipertensiva; (2) destruição da estrutura da parede do capilar, com extravasamento de proteínas plasmáticas e células sanguíneas; e (3) ativação do endotélio microvascular, que pode gerar ou amplificar uma cascata inflamatória, de importância, por exemplo, na patogênese de úlceras venosas (24).

## 1.4 – A Microcirculação na Hipertensão

Atualmente, a elevação crônica da resistência vascular sistêmica pode ser considerada como a principal alteração hemodinâmica na hipertensão arterial primária estabelecida (30). Neste contexto, é importante ressaltar que o aumento da resistência vascular na hipertensão arterial é determinado essencialmente na microcirculação (19). Funcionalmente, considera-se que o lado arteriolar da microcirculação compõe a maior parte dos vasos de resistência, o que significa que a maior parte da queda da pressão entre as grandes artérias e as veias ocorre neste segmento (22). Assim, a microcirculação é o principal segmento vascular de controle da resistência vascular e, conseqüentemente, da PA. Dessa forma, as modificações microvasculares podem estar diretamente relacionadas com a causa da hipertensão e podem servir como base para as lesões de órgão-alvo relacionadas à HAS no cérebro, coração, rim ou retina.

Na hipertensão, a estrutura e a função da microcirculação podem estar alteradas por pelo menos 3 formas distintas. Primeiro, os mecanismos que regulam o tônus vasomotor podem estar anormais, levando a uma vasoconstrição aumentada ou a respostas

vasodilatadoras reduzidas (31). Segundo, podem existir alterações anatômicas na estrutura dos vasos de resistência pré-capilares individuais, tais como um aumento na razão parede-luz (32). Finalmente, podem existir alterações ao nível da rede microvascular, possivelmente envolvendo a redução na densidade (rarefação) de arteríolas ou capilares num dado leito vascular. Vale notar que as contribuições relativas destes fatores serão diferentes nos diferentes leitos vasculares e podem variar entre as diferentes formas e modelos de hipertensão (24). Além disso, estudos da microcirculação unguinal mostraram que a rede microvascular de hipertensos apresenta uma pressão capilar elevada (33).

#### 1.4.1 – A Rarefação Microvascular na Hipertensão

A rarefação capilar e arteriolar parece ser a modificação mais comumente observada afetando a estrutura da rede microvascular. O primeiro estágio da rarefação é funcional e afeta o número de vasos perfundidos, mas não o número total de vasos da rede microvascular. Neste estágio, dilatadores potentes podem induzir o recrutamento de microvasos, que podem minimizar a diferença entre o número de vasos perfundidos nos animais hipertensos e normotensos (31). O segundo estágio é a rarefação anatômica que corresponde à diminuição no número total de arteríolas e/ou de capilares em um dado leito vascular, incluindo os vasos normalmente perfundidos, bem como os vasos recrutados durante a hiperemia reativa (34).

Diversas teorias explicam a rarefação microvascular na hipertensão. A rarefação pode ser tanto primária (antecedendo o início da hipertensão) quanto secundária (ocorrendo como uma conseqüência da elevação prolongada da PA). A rarefação primária pode resultar do impedimento da angiogênese e da formação da rede microvascular. A rarefação secundária, no entanto, pode ser causada pela diminuição da perfusão dos microvasos ou pela destruição de capilares existentes (35).

As relações de causa e efeito da rarefação na HAS ainda são controversas. Num modelo de hipertensão secundária em ratos induzida pela coarctação da aorta abdominal acima das artérias renais, (36), observa-se rarefação estrutural arteriolar nos músculos da pata. Como estes leitos vasculares não foram expostos a altas pressões neste modelo, mecanismos independentes da pressão foram responsabilizados pelos efeitos. No entanto, a rarefação arteriolar que se desenvolve durante a hipertensão em camundongos geneticamente deficientes em eNOS, foi prevenida nos animais que mantiveram a PA normal pela administração crônica de hidralazina (37).

#### 1.4.2 – Dados Experimentais da Rarefação na Hipertensão

Diversos estudos mostraram a rarefação estrutural microvascular em diferentes modelos experimentais e tecidos na hipertensão, incluindo o músculo esquelético (36, 38-41), o intestino (42) e a pele (43). Le Noble e cols. encontraram rarefação estrutural de capilares e pequenas arteríolas no músculo cremaster de SHR de 5-6 semanas antes de uma elevação substancial na PA (40). Também foi observado um aumento na razão parede-luz em pequenas artérias de resistência do mesentério em SHR em estágio pré-hipertenso (4 semanas) (44).

Em 1933, Ruedemann & Feihl relataram que pacientes hipertensos tinham um número de vasos na conjuntiva significativamente diminuídos, uma observação posteriormente confirmada por equipamentos de visualização mais sofisticados (45). Serne e cols. (46) estudaram a densidade capilar cutânea utilizando a video-microscopia intravital e demonstraram que a rarefação capilar de pacientes portadores de hipertensão arterial pode ser atribuída tanto a alterações funcionais quanto estruturais. Alterações morfológicas microcirculatórias de pacientes hipertensos também foram demonstradas em território de músculo esquelético (47, 48).

Existem evidências que a rarefação capilar na pele pode anteceder o início clínico da HAS. Pacientes com HAS limítrofe possuem densidades capilares cutâneas que são tão baixas, ou até mais baixas, que pacientes com hipertensão estabelecida (49). Além disso, a redução da vasodilatação microvascular e a rarefação capilar foram associadas com uma predisposição familiar à hipertensão (50).

Finalmente, Debbabi e cols. (51) avaliaram a densidade capilar da pele em pacientes com hipertensão primária sob tratamento crônico e efetivo com diferentes anti-hipertensivos, através da técnica de videocapilaroscopia intravital avaliada no dorso da pele da segunda falange do dedo. Neste estudo observacional, foi investigada a densidade capilar cutânea de pacientes hipertensos não-diabéticos tratados eficazmente por pelo menos 12 meses com diferentes classes de fármacos anti-hipertensivos e comparada com a densidade capilar de pacientes hipertensos não-tratados previamente e de pacientes normotensos. Este estudo mostrou que há rarefação capilar cutânea estrutural e funcional de pacientes com hipertensão essencial que nunca foram tratados. No entanto, os pacientes hipertensos submetidos ao tratamento farmacológico eficaz apresentavam densidade capilar cutânea estrutural e funcional comparáveis com as de indivíduos normotensos. Estes dados sugerem que o tratamento anti-hipertensivo pode reverter a rarefação capilar cutânea na hipertensão primária. Além disso, em pacientes hipertensos, tratados ou não, o índice de Framingham para o risco cardiovascular foi correlacionado negativamente com a densidade capilar.

### 1.4.3 – Mecanismos da Rarefação na Hipertensão

A densidade microvascular pode diminuir tanto pela morte do vaso quanto pela angiogênese insuficiente. Prewitt e cols. (38) utilizaram a videomicroscopia para investigar a microcirculação de músculo esquelético em SHR em vários estágios da doença e concluíram que fatores extra-neurais, possivelmente relacionados à hipersensibilidade do músculo liso vascular a vasoconstritores, primeiramente causavam fechamento reversível das arteríolas (rarefação funcional), seguido do desaparecimento anatômico.

A angiogênese deficiente observada na HAS tem sido alvo de numerosos estudos nos últimos anos (21, 52-54). Uma das razões para este interesse encontra-se nas evidências que a densidade microvascular anormalmente baixa pode ser vista em animais muito novos com hipertensão genética, porém ainda não hipertensos, e também ocorre em humanos normotensos com predisposição familiar para a doença, sugerindo um desenvolvimento prejudicado, ou seja, uma falta de capacidade do crescimento vascular acompanhar o crescimento do órgão.

Outra razão importante que relaciona as anormalidades no controle a longo prazo da angiogênese e a PA é o papel crucial do óxido nítrico (NO) em ambos os processos. O NO, cuja biodisponibilidade está reduzida na hipertensão, não é apenas um vasodilatador, mas também estimula a expressão de fatores de crescimento vascular, principalmente o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (55). O impedimento da angiogênese foi demonstrado diretamente na hipertensão experimental induzida pela inibição farmacológica crônica da síntese do NO (56).

### 1.4.4 – Apoptose e Rarefação Estrutural

As evidências experimentais sugerem que a rarefação microvascular está associada com a patogênese da hipertensão e pode ser acompanhada pela morte celular das células endoteliais dos vasos (57). O desaparecimento de microvasos em indivíduos hipertensos pode ser um evento secundário resultante da elevação da PA (38). Entretanto, um estudo em humanos demonstrou a presença de rarefação microvascular em indivíduos com hipertensão limítrofe que ainda apresentavam valores de PA próximas dos valores normais (50). Além disso, a perda de microvasos está relacionada com o desenvolvimento de condições patológicas não-hipertensivas, incluindo a disfunção de órgãos-alvo no diabetes mellitus (58). Estes achados sugerem que outros fatores além da elevação da PA podem promover o desaparecimento dos microvasos. As evidências indicam que o aumento na apoptose na célula endotelial nos microvasos pode causar a rarefação nos indivíduos hipertensos, embora o mecanismo deste aumento da apoptose celular ainda esteja sendo investigado (59, 60).

O desaparecimento dos vasos requer a remoção das células endoteliais, provavelmente após a sua morte. Dois modelos de morte celular predominam nos processos patológicos, a necrose e a apoptose. As características morfológicas distintas entre estes dois processos estão bem definidas (61, 62). A necrose é caracterizada por um embaralhamento irregular da cromatina nuclear, inchamento grosseiro das organelas citoplasmáticas, e pelo desenvolvimento de descontinuidades nas membranas, seguida pelo desaparecimento e desintegração dos compartimentos citoplasmáticos. A função normal da célula é perdida, ocorre lise celular, e há migração de leucócitos para a região lesada, dando início a um processo inflamatório geralmente associado à formação de fibrose tecidual. A apoptose geralmente apresenta compactação e marginalização da cromatina nuclear, formando uma massa com forma definida, condensação do citoplasma, seguida da transformação da célula em discretos fragmentos ligados à membrana (corpos apoptóticos). As células ou corpos apoptóticos são então fagocitadas por células teciduais adjacentes ou por macrófagos, com pequeno ou nenhum envolvimento de leucócitos neste processo. As células apoptóticas também podem ser expelidas para túbulos ou vasos e, assim, eliminadas. Durante a apoptose, a célula pode utilizar seus próprios genes e proteínas para direcionar esse processo (61, 63, 64). Os estímulos para a ocorrência de ambos os processos são bastante distintos. A necrose ocorre após uma injúria aguda, tais como o calor, a isquemia e a exposição a toxinas, geralmente em uma área contígua da célula. Por outro lado, a apoptose ocorre em células individuais, geralmente para manter a homeostase no organismo e, também, em algumas condições patológicas (60).

Em 1997, Gobé et al. utilizaram um modelo de hipertensão induzida em ratos pelo método de 1 rim / 1 clipe. Neste modelo, o rim subperfundido pelo clampeamento de sua artéria aferente libera uma quantidade aumentada de renina. Esta, por sua vez, irá levar a um aumento na formação de angiotensina II (Ang II) que provoca um aumento na produção e liberação de aldosterona pela glândula supra-renal. Assim, tanto Ang II quanto à aldosterona irão promover um aumento na pressão hidrostática da circulação sistêmica (60). Neste estudo, a análise ultraestrutural mostrou de forma inequívoca que as células endoteliais dos pequenos capilares entravam em apoptose. Estes resultados indicaram que a degradação da membrana basal ocorria próxima ao endotélio apoptótico e, neste caso, as células endoteliais apoptóticas podem ser capazes de migrar para o interstício, onde macrófagos podem degradá-las (figura 1.1).

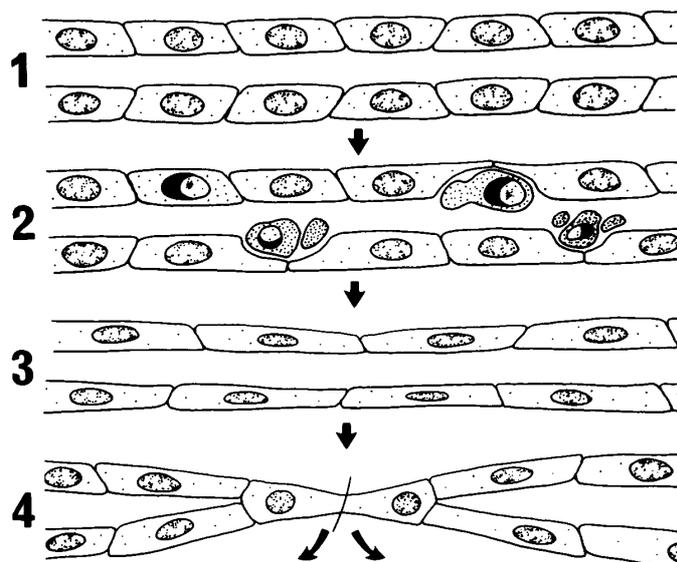


Figura 1.1 – Representação esquemática da rarefação microvascular envolvendo apoptose. Esquema 1 – mostra o endotélio microvascular normal. Após o insulto hipertensivo (esquema 2) as células endoteliais entram em apoptose e podem ocupar a luz do vaso. Embora não tenha sido demonstrado, algumas células endoteliais podem ser fagocitadas por células teciduais adjacentes ou por macrófagos. No esquema 3, as células remanescentes se esticam sobre a membrana basal desnuda, de tal forma que, com a perda progressiva de células por apoptose e com o adelgaçamento da camada de células endoteliais, os vasos se retraem (esquema 4) e a “rarefação estrutural” ocorre (60).

As arteríolas são geralmente vistas como o último local de defesa na hipertensão (19) protegendo a rede capilar da pressão hidrostática excessiva. Apesar desta proteção, por que ocorre apoptose no endotélio capilar? As seguintes propostas procuram esclarecer esta questão: (1) A defesa arteriolar pode ser perdida, permitindo uma pressão sanguínea anormalmente alta nos capilares (65). As forças de cisalhamento resultantes podem então causar a perda do contato entre a membrana basal e a célula endotelial, que é uma causa conhecida de apoptose. (2) Um fluxo sanguíneo maior que o normal pode induzir a um efeito hiperóxico que podem causar apoptose na célula endotelial. (3) A constrição das arteríolas podem levar a um efeito isquêmico de leve a moderado, que é causa conhecida de apoptose em outras circunstâncias (61, 66, 67). (4) A reperfusão após a constrição inicial das arteríolas pode causar dano oxidativo. O estresse oxidativo causa apoptose (68). (5) Os fatores humorais ou os fatores de crescimento sanguíneos podem estar presentes em níveis alterados. O aumento ou a perda de fatores de crescimento podem causar apoptose endotelial (69-71).

Mais recentemente, Kobayashi et al. (72) demonstraram que antioxidantes permeáveis às células previnem a apoptose de células endoteliais microvasculares e a perda de microvasos durante o crescimento de SHR. A estimulação da superóxido desmutase pode inibir a elevação da pressão sanguínea como resultado da melhora na vasodilatação dependente de endotélio, já que o ânion superóxido reage com o NO e impede a vasodilatação induzida por NO (73, 74). Os resultados de Kobayashi et al. em 2005 geraram uma nova possibilidade, a de

que os antioxidantes previnem a perda dos microvasos e, conseqüentemente, suprimem o aumento na resistência vascular sistêmica. Embora ainda seja controverso se a rarefação microvascular nos indivíduos hipertensos é a causa ou a conseqüência da elevação da pressão sanguínea, algumas evidências indicam que o desaparecimento dos microvasos precede o desenvolvimento da hipertensão arterial (50, 58). A perda de microvasos observada em SHR mais jovens, nos quais a PA ainda não se encontra totalmente elevada, dá suporte a esta hipótese (72).

A marcação de células apoptóticas por fluorescência, através da técnica de *TUNEL*, mostram que sob certas condições, após a exposição cirúrgica, as células endoteliais microvasculares em SHR estão mais propensas ao processo apoptótico que as células de ratos WKY, sendo este processo apoptótico atenuado por antioxidantes (72).

Parece que a inibição da apoptose celular por antioxidantes contribui para a prevenção da rarefação microvascular (72). Estes resultados sugerem que esta inibição pode ser a conseqüência do estresse oxidativo aumentado nos microvasos em SHR. Diversas evidências sugerem que a supressão das espécies reativas de oxigênio inibe a apoptose celular. Primeiramente, antioxidantes administrados topicamente previnem a apoptose celular endotelial nos microvasos sem afetar a PA sistêmica. Em segundo lugar, nos SHR mais jovens, o tratamento sistêmico com antioxidantes diminui a apoptose celular endotelial sem uma variação significativa da pressão sanguínea. Além disso, a apoptose celular foi suprimida não apenas nas arteríolas como também nos capilares e nas vênulas, vasos em que a pressão sanguínea é equivalente aos animais normotensos (75). Embora o mecanismo preciso pelo qual o estresse oxidativo promova a apoptose da célula endotelial nos microvasos não esteja totalmente elucidado, as evidências de experimentos *in vitro* sugerem que diversas vias, como a ativação da JNK/p38 MAP quinase (76, 77), modificações na integridade mitocondrial (78) e a perda na biodisponibilidade do NO (79-81), podem mediar a apoptose induzida por espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais vasculares, agindo de forma independente da PA.

### **1.5 – Implicações Patogênicas da Rarefação Microvascular**

Os dados mostrados acima sugerem que as anormalidades microvasculares podem iniciar a seqüência patogênica na HAS primária. Dessa forma, a HAS pode ser vista como uma anormalidade desenvolvida, pelo menos em parte, pela microcirculação. Assim existem evidências diretas do potencial angiogênico reduzido em SHR. O soro de SHR de 6 semanas possui menor capacidade de induzir angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de ave quando comparado com o soro de ratos normais (21).

Além de afetar a resistência, a rarefação tem o potencial de perturbar o acesso celular de nutrientes e oxigênio. A rarefação microvascular tende a reduzir a área de superfície do vaso disponível para a liberação de oxigênio e a aumentar a distância de difusão entre os vasos e as células alvo. A isquemia relativa resultante pode ser a principal responsável pelas lesões de órgão-alvo associadas à hipertensão. Evidências a este respeito surgem a partir de medidas teciduais da pressão parcial de oxigênio em modelos de ratos hipertensos, onde foi vista uma hipóxia relativa no cremaster (82, 83), um músculo cuja rarefação foi demonstrada de forma consistente (39, 40), porém não no espinotrapézio, um músculo onde não é encontrada rarefação (84).

#### 1.5.1 – Lesões de Órgão-Alvo Relacionadas à HAS

O principal problema associado à HAS consiste nas lesões de órgão-alvo associados a esta doença. Estas lesões levam a estados de morbi-mortalidade, acometendo, sobretudo, o cérebro, o rim, o coração, os vasos periféricos e a retina.

Os acidentes vasculares cerebrais (AVC) podem ser classificados em 2 grupos: isquêmico e hemorrágico. A isquemia cerebral, o mais freqüente, é a consequência da aterotrombose nas artérias que irrigam o cérebro ou de embolismo das mesmas. O hemorrágico representa 15-20% das causas de acidente vascular cerebral (85). Os infartos lacunares, causados pela oclusão de pequenas artérias finais não-ramificadas (geralmente menores que 500 µm de diâmetro) (86), estão geralmente associados à HAS (87, 88). Assim, A HAS está diretamente relacionada com os riscos de ocorrência de AVC.

A hipertrofia do ventrículo esquerdo é uma condição em que o músculo cardíaco se adapta à resistência aumentada na circulação sistêmica. O maior trabalho exercido pelo músculo cardíaco em razão da PA aumentada, como na HAS ou na estenose aórtica, causa hipertrofia do músculo cardíaco com um aumento resultante na espessura do miocárdio para compensar a sobrecarga de trabalho do coração. Esta condição é um fator independente de morbidade e mortalidade cardiovascular. A HAS pode aumentar o risco de AVC, de doença cardíaca isquêmica e, até mesmo, ser um fator importante no desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva (89-91). O remodelamento do miocárdio na hipertrofia induzida por HAS inclui o aumento do tamanho do cardiomiócito e a deposição de colágeno de matriz intersiticial e perivascular, levando à hipertrofia do coração. As alterações da microcirculação coronariana na hipertrofia do ventrículo esquerdo também parecem ter um papel importante nas lesões de órgão-alvo (92, 93). A diminuição significativa da reserva no fluxo coronariano, observada nestas condições, decorrente de obstrução coronariana importante (>75%), constitui o principal marcador de significado fisiológico da isquemia

miocárdica, visto que em áreas perfundidas por artérias livres de obstruções, esse fluxo pode aumentar até três vezes o valor de repouso (94). Em SHR (95, 96) bem como em SHR propensos ao derrame (SHRSP), as densidades capilares no coração hipertrofiado são menores que nos controles normotensos de mesma idade, o que pode prejudicar a perfusão cardíaca. De fato, o número de capilares não acompanha a hipertrofia dos cardiomiócitos, o que leva a uma redução na distância de difusão por capilar (uma medida de perfusão capilar). Este fenômeno resulta em um estado semelhante à isquemia nos ratos hipertensos comparados com o controle. Além disso, no miocárdio, aparecem modificações na síntese e deposição de colágeno resultando em um maior espessamento da parede do miocárdio. Este processo reduz a capacidade do coração de suplantar a demanda de fluxo sanguíneo normal da circulação (97).

A HAS é um importante fator de risco para a doença isquêmica coronariana (98, 99). A patogênese é decorrente de um estreitamento ou oclusão das artérias coronarianas por aterosclerose, que limita o fluxo sanguíneo ou causa o infarto miocárdico no caso de ruptura da placa aterosclerótica. Também pode ser devido ao remodelamento das artérias coronarianas ou a uma isquemia silenciosa com alterações da microvasculatura do coração (100-102). De fato, a HAS crônica resulta em hipertrofia cardíaca e sem um crescimento associado da circulação coronariana poderia levar a uma isquemia cardíaca. A consequência eventual é um impedimento do fluxo coronariano de reserva. As principais modificações estruturais na hipertensão são observadas em pequenas artérias e arteríolas: alteração da espessura da luz dos vasos foi demonstrada em SHR (103) e um aumento da fibrose perivascular e intersticial foi demonstrado em ratos em modelos hipertensão renovascular (104-107). Estas modificações impedem o suprimento adequado de oxigênio aos cardiomiócitos pelo aumento da resistência coronariana. A rede capilar é um determinante crucial para o suprimento de oxigênio no coração. De fato, a densidade capilar e a distância inter-capilar são parâmetros importantes para se acessar a isquemia. Na doença hipertensiva, a densidade capilar está diminuída (rarefação) (19) e, dependendo do tamanho do cardiomiócito, as distâncias inter-capilares estão aumentadas, o que pode prejudicar o quadro de isquemia do miocárdio (97).

### **1.6 – Tratamento Farmacológico da HAS**

Os fármacos anti-hipertensivos podem ser classificados de acordo com os seus mecanismos de ação. Já que a PA é diretamente proporcional ao produto do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, ela pode ser reduzida por ações de fármacos isoladamente em um destes parâmetros hemodinâmicos ou em ambos. Os fármacos podem diminuir o

débito cardíaco tanto pela inibição da contratilidade do miocárdio quanto pela redução da pressão de enchimento do ventrículo. A redução na pressão de enchimento do ventrículo pode resultar de ações sobre o tônus venoso, como na vasodilatação induzida por antagonistas do receptor  $\alpha$ -adrenérgico, ou sobre o volume sanguíneo através de efeitos renais, como visto através dos efeitos dos fármacos diuréticos. Os fármacos podem reduzir a resistência periférica atuando no músculo liso vascular causando relaxamento dos vasos de resistência ou interferindo com a atividade de sistemas que produzem a constrição de vasos de resistência (ex. o sistema nervoso simpático).

O uso simultâneo de fármacos com mecanismos de ação e efeitos hemodinâmicos similares geralmente trazem poucos benefícios adicionais. No entanto, o uso concomitante de fármacos de diferentes classes é uma estratégia para se atingir o controle efetivo da PA com efeitos adversos reduzidos pelo uso de doses individuais menores.

Para pacientes com hipertensão arterial em estágio 1 (pressão sistólica medida no consultório entre 140-159mmHg e pressão diastólica entre 90-99mmHg) há a indicação de tratamento não-medicamentoso através das seguintes medidas: controle de peso, modificação no padrão alimentar, redução do consumo de sal, moderação no consumo de bebidas alcoólicas, exercício físico, abandono do tabagismo e controle do estresse psicoemocional, podem ser utilizadas isoladamente no controle da PA e na diminuição do risco cardiovascular. No entanto, para os pacientes que não responderam às medidas não-medicamentosas, o uso de qualquer medicamento dos grupos de anti-hipertensivos, com exceção dos vasodilatadores de ação direta, pode ser utilizado para o controle da PA como monoterapia inicial.

Para pacientes em estágios 2 (pressão sistólica medida no consultório entre 160-179 mmHg e pressão diastólica entre 100-109 mmHg) pode-se considerar o uso de associações fixas de medicamentos anti-hipertensivos como terapia inicial, sendo que para pacientes em estágio 3 (pressão sistólica medida no consultório  $\geq$  180 mmHg e pressão diastólica  $\geq$  110 mmHg), de HAS a terapia inicial com associações de anti-hipertensivos é recomendada (9).

As associações mais comuns são entre os diuréticos com as outras classes de fármacos anti-hipertensivos e entre bloqueadores de canais de cálcio com betabloqueadores, inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) ou antagonistas do receptor  $AT_1$  (9).

#### 1.6.1 – Antagonistas do Receptor $\beta$ -Adrenérgico

Não se esperava efeitos anti-hipertensivos nos fármacos bloqueadores do receptor  $\beta$ -adrenérgico quando foram investigados inicialmente. No entanto, o pronetalol, um fármaco que nunca foi comercializado, promoveu a redução da PA em pacientes hipertensos com

angina pectoris. Este efeito anti-hipertensivo foi subseqüentemente demonstrado para o propranolol e para todos os outros antagonistas do receptor  $\beta$ -adrenérgico (108).

O antagonismo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos afeta a regulação da circulação através de diversos mecanismos, incluindo a redução na contratilidade do miocárdio e da frequência cardíaca e, conseqüentemente, do débito cardíaco. Um importante efeito do bloqueio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos que contribui de maneira significativa para os efeitos anti-hipertensivos desta classe de fármacos é a redução na secreção de renina com uma conseqüente queda nos níveis de Ang II. A redução na formação de Ang II e, conseqüentemente, de seus efeitos múltiplos no controle circulatório e sobre a aldosterona, contribui de forma significativa para a ação anti-hipertensiva desta classe de fármacos, agindo em conjunto com os efeitos cardíacos. Existem claramente efeitos dos bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, particularmente em altas doses, que são independentes de renina. Diversos mecanismos foram postulados para explicar a redução na PA independente de renina, incluindo: a alteração do controle do sistema nervoso simpático ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC), uma modificação na sensibilidade do barorreceptor, uma alteração na função periférica adrenérgica neuronal, e um aumento na biossíntese de prostaciclina (108).

#### 1.6.2 – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

O desenvolvimento dos IECAs é uma história fascinante. Esta história difere de outras importantes descobertas que tiveram como cenário laboratórios localizados em países ricos do hemisfério norte e como protagonistas cientistas americanos, europeus ou japoneses, pois se deu predominantemente em laboratórios brasileiros (109). Em 1949, Rocha e Silva e associados relataram que a tripsina e os venenos de algumas cobras liberavam do plasma uma substância hipotensora (110). Também observaram que ela provocava o estímulo de contrações lentas intestinais e batizaram a nova substância de bradicinina. As cininas possuem uma gama de efeitos sobre a regulação de processos relevantes como inflamação, coagulação e reatividade endotelial. As enzimas inativadoras são as cininases, que transformam as cininas e calidinas em fragmentos inativos. A cininase II é idêntica à enzima conversora da angiotensina (também conhecida como peptidil dipeptidase).

Nos anos sessenta, Ferreira et al. relataram a descoberta de que peptídeos extraídos do veneno da jararaca aumentavam os efeitos da bradicinina (109). Os fatores potencializadores da bradicinina agiam via inibição da cininase II. Posteriormente, foi estabelecido que se tratava da mesma enzima conversora da angiotensina. O reconhecimento de um grande potencial de uso clínico levou ao desenvolvimento do primeiro inibidor da

enzima conversora da angiotensina (IECA) utilizado por via oral. O captopril foi obtido a partir de pesquisas com um fator potencializador da bradicinina, o teprotide.

A seguir, enalapril, lisinopril, quinapril, ramipril, benazepril, moexipril, fosinopril, trandolapril e perindopril também se tornaram disponíveis. Estes fármacos se mostraram úteis no tratamento da HAS devido à eficácia e ao perfil favorável de efeitos adversos, que aumentam a adesão.

São eficazes no tratamento da hipertensão arterial reduzindo a morbidade e a mortalidade cardiovasculares nos hipertensos (111, 112), pacientes com insuficiência cardíaca (113, 114), pacientes com infarto agudo do miocárdio, em especial quando apresentam baixa fração de ejeção (115) e pacientes de alto risco para doença aterosclerótica (115). Quando administrados em longo prazo, os inibidores da ECA retardam o declínio da função renal em pacientes com nefropatia diabética ou de outras etiologias (116-118).

### 1.6.3 – Antagonistas do Receptor AT<sub>1</sub> de Angiotensina II

A importância da Ang II na regulação da função cardiovascular levou ao desenvolvimento de antagonistas não-peptídicos do receptor de Ang II para uso clínico. Assim, o losartan, o candesartan, o irbesartan, o valsartan, o telmisartan e o eprosartan foram aprovados para o tratamento da HAS. Por impedir os efeitos da Ang II, estes agentes relaxam o músculo liso vascular e promovem vasodilatação, aumentam a excreção de sal e água, reduzem o volume plasmático e diminuem a hipertrofia celular. Os antagonistas do receptor de Ang II também superam teoricamente algumas desvantagens dos iECA, já que os iECA não apenas impedem a conversão de angiotensina I em Ang II, mas também impedem a degradação de bradicinina e de substância P mediada pela ECA. A tosse, um efeito adverso associado aos iECA não foi associado aos antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> de Ang II. O angioedema ocorre raramente (108).

Dois subtipos distintos de receptores de Ang II foram clonados, designados como tipo I (AT<sub>1</sub>) e tipo II (AT<sub>2</sub>). O subtipo de receptor AT<sub>1</sub> de Ang II está localizado predominantemente no tecido vascular e miocárdico e também no cérebro, rim e células glomerulosas adrenais, que secretam aldosterona. O subtipo de receptor AT<sub>2</sub> de Ang II é encontrado na medula adrenal, rim e no SNC e pode ter um papel no desenvolvimento vascular (119). Tendo em vista que o receptor AT<sub>1</sub> encontra-se envolvido com a inibição da liberação de renina por retroalimentação, as concentrações de renina e Ang II estarão aumentadas durante o antagonismo do receptor AT<sub>1</sub>. As conseqüências clínicas dos efeitos do aumento de Ang II sobre um receptor AT<sub>2</sub> não-inibido não são conhecidas; no entanto, alguns

dados sugerem que o receptor AT<sub>2</sub> pode ter efeitos de inibição do crescimento e respostas anti-proliferativas (108).

Os efeitos dos iECA que resultam da inibição das funções relacionadas com a AngII também ocorrem com os antagonistas do receptor AT<sub>1</sub>. Estes efeitos incluem: hipotensão, hipercalemia e função renal reduzida, incluindo aquela associada com estenose da artéria bilateral renal.

Em contraste com os iECA, os antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> não causam tosse. Foi descrito angioedema, no entanto não está claro se o angioedema em pacientes que fazem uso de antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> é maior do que na população em geral. Além disso, também foi descrito disfunção hepática com o uso desta classe de anti-hipertensivos (108).

Os fármacos antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> são eficazes no tratamento da hipertensão. Estudos recentes comprovam seu efeito benéfico na insuficiência cardíaca congestiva (120, 121). No tratamento da hipertensão arterial, foram testados, basicamente, em populações de alto risco cardiovascular ou com comorbidades. São nefroprotetores no paciente diabético tipo 2 com nefropatia estabelecida (106, 122, 123). Entretanto, contrariamente aos inibidores da ECA, não reduziram a mortalidade total nessa população (124). Em hipertensos idosos com hipertrofia ventricular esquerda (125, 126), foi demonstrado que a losartana diminui a mortalidade e a morbidade cardiovasculares de forma superior à observada com o atenolol, especialmente acidente vascular cerebral. Mais recentemente, metanálise envolvendo 21 estudos clínicos randomizados (16 com inibidores da ECA e 5 com bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub>) constatou redução de eventos coronarianos apenas com os inibidores da ECA (127). O tratamento com bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub>, assim como o uso de iECA, vem sendo associado a menor incidência de novos casos de diabetes melito do tipo 2 (125, 128-130).

#### 1.6.4 – Antagonistas do Canal de Ca<sup>2+</sup>

O racional para o uso desta classe de fármacos na HAS vem da compreensão que a HAS é o resultado do aumento da resistência vascular periférica. Já que a contração do músculo liso vascular é dependente da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular livre, a inibição da movimentação transmembranar de Ca<sup>2+</sup> deve diminuir a quantidade total de Ca<sup>2+</sup> que alcança os sítios intracelulares. De fato, todos os bloqueadores dos canais de Ca<sup>2+</sup> diminuem a PA pelo relaxamento do músculo liso arteriolar e pela diminuição da resistência vascular periférica (131). Como conseqüência da diminuição da resistência vascular periférica, os bloqueadores dos canais de Ca<sup>2+</sup> desencadeiam uma descarga simpática mediada por baroreceptores. No caso das diidropiridinas, esta estimulação simpática tem como conseqüência taquicardias leves a moderadas que surgem a partir da estimulação do nodo

sinoatrial. No entanto com verapamil e diltiazem esta taquicardia é mínima ou ausente devido aos efeitos cronotrópicos negativos diretos destes dois agentes. Esta taquicardia reflexa observada sobretudo com o uso da nifedipina deve ser levada em consideração nas decisões de uso deste fármaco no tratamento da HAS, particularmente em pacientes propensos à insuficiência cardíaca. A resposta reflexa adrenérgica aos bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  também serve para atenuar o efeito hipotensor destes fármacos; portanto, quando a vasoconstrição reflexa encontra-se diminuída, como em idosos ou durante o tratamento com antagonistas do receptor  $\alpha$ -adrenérgico, o efeito hipotensor dos bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  é consideravelmente aumentado, algumas vezes de forma excessiva, podendo levar a um quadro de hipotensão aguda (108).

Uma revisão dos ensaios que avaliaram os efeitos dos agentes anti-hipertensivos na massa do ventrículo esquerdo concluiu que, embora os bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  reduzam a massa do ventrículo esquerdo mais efetivamente que os diuréticos, eles são menos eficazes que os iECA e a metildopa (132).

Os bloqueadores dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são anti-hipertensivos eficazes e reduzem a morbidade e a mortalidade cardiovasculares (111, 112, 128, 133). Em comparação com outros antihipertensivos, levam a menor redução nas taxas de hospitalização por insuficiência cardíaca e infarto do miocárdio. Deve-se dar preferência aos bloqueadores dos canais de cálcio de ação de longa duração intrínseca ou por formulação galênica que permita uma liberação controlada. Não são recomendados agentes de curta duração (9).

Estudos recentes reafirmaram a eficácia, a tolerabilidade e a segurança do uso dessa classe de medicamentos no tratamento da hipertensão arterial (128, 134, 135). No estudo ASCOTT LLA, verificou-se interação favorável entre o bloqueador de canal de cálcio e a vastatina, provavelmente pelo sinergismo desses medicamentos na liberação de NO pela célula endotelial (9).

A nifedipina foi o primeiro membro do grupo das diidropiridinas a ser sintetizado (136). Esta classe de drogas apresenta potente atividade vasodilatadora *in vivo* e *in vitro*. A nifedipina quando administrada por via intravenosa aumenta o fluxo sanguíneo dos membros superiores com pouco efeitos sobre o enchimento venoso; isto indica uma dilatação seletiva dos vasos de resistência arteriais. No entanto, a nifedipina relaxa o músculo liso vascular em concentrações significativamente menores que aquelas requeridas para efeitos diretos proeminentes no coração. Assim, a resistência arteriolar e a PA são reduzidas, a contratilidade e a função ventricular segmentar são aumentadas, e a frequência e o débito cardíacos são aumentados modestamente (137, 138). Após a administração oral de nifedipina, a dilatação arterial aumenta o fluxo sanguíneo periférico; e o tônus venoso não se modifica.

### 1.7 – Efeitos do Tratamento Farmacológico da HAS na Microcirculação

Já que a rarefação é realmente importante na fisiopatologia da HAS, resta saber se esta é afetada pela terapia farmacológica. Recentemente, um estudo observacional cruzado com pacientes hipertensos crônicos tratados farmacologicamente, pacientes com hipertensão recém-descoberta e pacientes normotensos mostraram um aumento na densidade capilar cutânea de pacientes hipertensos efetivamente tratados farmacologicamente (51). O direcionamento da microcirculação na prevenção das lesões de órgão-alvo e no tratamento da HAS envolve dois objetivos principais: a reversão da rarefação microvascular e a redução da relação parede-luz de pequenas artérias.

A maioria das classes de agentes anti-hipertensivos utilizados foram investigados em relação a estes parâmetros, pelo menos em modelos animais, com diferenças claras entre as mesmas. Com exceção dos  $\beta$ -bloqueadores, todas as classes de fármacos anti-hipertensivos utilizadas atualmente na clínica mostraram capacidade de afetar a angiogênese em modelos específicos não-hipertensos e de influenciar a rarefação microvascular em hipertensão experimental (22, 56).

#### 1.7.1 - $\beta$ -Bloqueadores

Embora os  $\beta$ -bloqueadores sejam amplamente utilizados como agentes anti-hipertensivos, existem poucas evidências que eles exerçam uma ação benéfica marcante na estrutura da microcirculação ou na rarefação microvascular. O tratamento com propranolol não modificou a área de seção cruzada da parede do vaso ou o diâmetro externo da dilatação máxima das arteríolas cerebrais em SHRSP (139). Em pacientes hipertensos, o tratamento com atenolol por 1 ano não produziu nenhum aumento significativo na razão parede-luz de pequenas artérias subcutâneas (140).

Um estudo recente da perfusão do miocárdio comparando o tratamento crônico de pacientes hipertensos durante 1 ano com perindopril (iECA) e com atenolol concluiu que o  $\beta$ -bloqueador foi incapaz de aumentar a reserva coronariana e de reduzir a massa do ventrículo esquerdo (141). Em outro estudo, foi comparada a hiperemia reativa (um índice de vasodilatação dependente de endotélio) em pacientes hipertensos tratados com diversas classes de anti-hipertensivos. O uso crônico de  $\beta$ -bloqueadores não modificou o fluxo sanguíneo máximo de membro superior durante a hiperemia reativa gerada pela oclusão do fluxo sanguíneo arterial durante 5 minutos ou após a administração sublingual de nitroglicerina (142).

### 1.7.2 – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

Os efeitos farmacológicos dos iECA estão relacionados com a vasodilatação, a recuperação da função endotelial e à intervenção no processo de remodelamento dos vasos sanguíneos e do coração. A inibição da ECA reduz ou previne o remodelamento interno vascular observado em indivíduos hipertensos (143). Em SHR, a inibição da ECA reduziu a hipertrofia cardíaca (144, 145). Quando comparado com o atenolol, o tratamento com perindopril resultou em uma maior reserva coronariana associada à regressão da estrutura hipertensiva da artéria de resistência e da hipertrofia do ventrículo esquerdo (141). Os iECA possuem efeitos anti-proliferativos e anti-migratórios em células de músculo liso, em neutrófilos e em linfócitos mononucleares. Eles também diminuem o estresse oxidativo, aumentam a fibrinólise endógena, possuem efeitos anti-plaquetários e, em animais, podem ser anti-aterogênicos e capazes de estabilizar plaquetas (146). Em um estudo independente, o tratamento crônico de SHRSP com ramipril em dose anti-hipertensiva, foi cardio- e vaso-protetor, prevenindo a hipertrofia e a necrose celular. Estes efeitos foram associados com uma redução significativa dos níveis de RNAm para proteínas da matriz extracelular, porém com aumento na expressão do gene para VEGF (147).

A situação a respeito dos efeitos dos iECA sobre a estrutura e a densidade de microvasos é complexa e tem sido alvo de numerosos estudos recentes. Um aumento marcante na atividade da ECA foi demonstrado nas paredes arteriolas de músculo periférico em SHR e o tratamento com iECA mostrou inibir amplamente, mas não completamente, esta atividade local de ECA (31). Parece claro que a inibição da ECA pode reduzir a razão parede-luz dos vasos de resistência em SHR (139, 148) e de arteríolas aferentes renais em ratos hipertensos geneticamente (149). Em pacientes hipertensos sem tratamento prévio, o tratamento com iECA, mas não com  $\beta$ -bloqueador causou uma redução na razão parede-luz de pequenas artérias em biópsias de glúteo (140). Mais recentemente, foram comparados os efeitos dos iECA, dos antagonistas de cálcio, dos beta-bloqueadores e dos diuréticos na hiperemia reativa em pacientes hipertensos. Os achados sugeriram que os iECA aumentam o fluxo sanguíneo em membros superiores durante a hiperemia reativa, em pacientes com HAS essencial, através do aumento da produção de NO (142).

Os efeitos da inibição da ECA na rarefação microvascular, entretanto, são mais controversos. A Ang II é conhecida por possuir efeitos angiogênicos, portanto, o bloqueio de sua produção ou ação deveria induzir rarefação. Uma complicação a mais é que a Ang II pode afetar independentemente as densidades arteriolar e capilar. Em ratos, a hipertrofia cardíaca hipertensiva induzida pela administração crônica de Ang II foi associada com uma diminuição de 18% na densidade capilar, mas também com um aumento de 54% na densidade arteriolar

(150). Uma outra evidência para a regulação independente da densidade capilar e arteriolar foi obtida recentemente (151) em ratos Goldblatt 1-rim, 1-clip. Após 4 semanas de hipertensão renovascular, houve um aumento significativo na densidade arteriolar miocárdica e um decréscimo na densidade capilar. O tratamento com o iECA perindopril normalizou a densidade arteriolar, mas não recuperou os índices de baixa densidade capilar miocárdica, apesar da completa normalização da PA. A combinação de perindopril e do diurético indapamida, entretanto, resultou na normalização da densidade capilar e arteriolar. Similarmente, os tratamentos de SHRSP com baixas doses de perindopril ou em associação com indapamida aumentaram as densidades capilares e de miócitos no miocárdio, porém a densidade arteriolar diminuiu. Neste caso, o aumento na capilarização foi um efeito indireto da pequena diminuição da hipertrofia cardíaca (95).

A inibição da degradação de bradicinina, mais do que os efeitos mediados por Ang II, podem ser responsáveis pelos efeitos pró-angiogênicos dos iECA (152). A deficiência do receptor de bradicinina  $B_2$  acaba com a vascularização induzida por iECA em patas isquêmicas de camundongos (153). Em um modelo de insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio, o icatibant, um antagonista do receptor  $B_2$ , preveniu o aumento na densidade de capilares do coração que havia sido induzida por doses altas e baixas de iECA. De forma interessante, o icatibant não mostrou nenhum efeito na angiogênese (154, 155). É possível que os níveis de cinina sejam muito baixos para afetar a densidade vascular sem os iECA, ou que o bloqueio do sistema renina angiotensina é necessário para as cininas afetarem a densidade vascular (155). Este efeito da bradicinina na angiogênese através da via do receptor  $B_2$ , ficou evidenciado em dois estudos independentes: um modelo *in vitro* de angiogênese no coração e pelo uso de animais deficientes correspondentes. Assim, pode-se concluir que a inibição da ECA leva à angiogênese através da via do receptor de bradicinina  $B_2$  (35).

O efeito pró-angiogênico da bradicinina na densidade vascular pode requerer também NO e VEGF e/ou prostaglandinas (156). A rarefação capilar miocárdica em ratos obesos foi acompanhada da diminuição da expressão de VEGF e de NO sintase endotelial (157). Similarmente, a densidade microvascular aumentada na pata traseira isquêmica de ratos após o tratamento com iECA foi associada com a regulação positiva da NO sintase endotelial (153). A diminuição da biodisponibilidade de NO também contribui para a rarefação microvascular em músculo esquelético de ratos obesos Zucker, um modelo de síndrome metabólica (158). Em um modelo de hipertensão secundária em rato com a inibição da biossíntese de NO, o desenvolvimento de tecido conectivo vascular foi substancialmente

reduzido; entretanto, este efeito não foi visto em um modelo diferente com um mecanismo independente de NO de hipertensão secundária (56).

A maioria dos estudos suportam um papel pró-angiogênico para os iECA. A simples deficiência do gene da ECA em camundongos já é responsável por aumentar a densidade capilar em músculo esquelético soleus em relação aos animais selvagens, conforme indicado pelo número médio de capilares ao redor das fibras do tipo IIa (159). Similarmente, a inibição da ECA pré-natal em SHR resultou na atenuação parcial da hipertensão bem como da hipertrofia do ventrículo esquerdo, 180 dias após o nascimento. Neste estudo, o tratamento gestacional com iECA foi capaz de aumentar a densidade de volume de vasos intramiocárdicos dos animais adultos quando comparados com os animais SHR não-tratados, com pequena ou nenhuma diferença nos miócitos e no interstício, sugerindo o envolvimento de um mecanismo angiogênico direto (160).

Outros modelos animais também foram capazes de descrever o efeito pró-angiogênico desta classe farmacológica. Assim, a inibição da ECA com quinalaprilat promoveu angiogênese em um modelo de isquemia da pata traseira em coelhos (161). De forma similar, a administração de perindopril a SHR foi capaz de restaurar a angiogênese prejudicada nestes animais em um modelo de isquemia da pata traseira (162). Além disso, a administração de lisinopril a ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina levou a um aumento da densidade capilar no músculo extensor longo da pata e a um aumento da relação capilar por fibra muscular no músculo soleus (163).

### 1.7.3 – Antagonistas do Receptor do Tipo I de Angiotensina II (AT<sub>1</sub>)

O desenvolvimento de antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> ocorreu em razão da ECA também mediar o metabolismo do sistema da bradicinina e devido à formação de Ang II poder ocorrer em função da ação de outras enzimas como a quimase. É bem conhecido que o SRA possui um papel crucial na fisiopatologia das doenças cardiovasculares através da ação da Ang II. Assim, a interrupção direta dos efeitos adversos da Ang II através dos receptores AT<sub>1</sub> fez dos bloqueadores do receptor de angiotensina II (AT<sub>1</sub>) uma linha importante na pesquisa cardiovascular. As ações dos antagonistas AT<sub>1</sub> também podem ser mediadas através dos receptores AT<sub>2</sub>, considerando que a Ang II estará mais disponível para estimular os receptores AT<sub>2</sub>. Os principais efeitos desta estimulação são vasodilatação, anti-proliferativo e ativação de NO (97). Os níveis plasmáticos de renina e de Ang II aumentam quando o receptor AT<sub>1</sub> está bloqueado (164); assim, os efeitos da Ang II no receptor AT<sub>2</sub> podem incluir a liberação de cininas e NO – moléculas que medeiam a angiogênese (165).

Menos dados estão disponíveis para os bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub> na estrutura e rarefação microvascular e resultados conflitantes têm sido obtidos. O bloqueio AT<sub>1</sub> aumentou a densidade capilar do ventrículo esquerdo em SHR propensos ao infarto (166) e normalizou as modificações induzidas por Ang II nas densidades capilar e arteriolar cardíacas (150). Similarmente, a densidade microvascular diminuída após a indução de infarto do miocárdio em ratos transgênicos com uma superexpressão cardioseletiva do receptor AT<sub>1</sub> foi amenizada pelo bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> com losartan. Estes dados sugerem que a eficácia dos bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub> pós-infarto do miocárdio pode ser devida não apenas à atenuação do remodelamento do ventrículo esquerdo, mas também por um efeito estimulatório na angiogênese (167). O bloqueador AT<sub>1</sub> losartan também diminuiu a relação parede-luz das arteríolas aferentes renais em SHR (149). Por outro lado, o tratamento com losartan em animais muito jovens não foi capaz de aumentar significativamente a densidade de comprimento capilar cardíaca, apesar da atenuação no desenvolvimento da hipertensão (154).

Tanto o subtipo de receptor AT<sub>1</sub> quanto o subtipo AT<sub>2</sub> têm sido implicados em angiogênese; em um modelo de rarefação capilar peritubular renal em ratos Sprague-Dawley, o losartan reverteu a rarefação através da indução da expressão de VEGF e o bloqueador AT<sub>2</sub> PD123319 aumentou a densidade capilar através da regulação positiva do receptor de VEGF, bem como de angiopoietina e de seu receptor Tie-1 (168). Por outro lado, o bloqueador AT<sub>1</sub> valsartan não teve efeito na microcirculação do músculo máximo cutâneo em SHR jovens (41).

#### 1.7.4 – Bloqueadores dos Canais de Cálcio

Os bloqueadores dos canais de cálcio afetam o transporte de cálcio no compartimento intracelular de células cardíacas e vasculares. Assim, estes agentes levam ao relaxamento dos vasos sanguíneos e à diminuição do trabalho cardíaco. Os níveis diminuídos de Ca<sup>2+</sup> intracelular nas células do músculo liso vascular resultam em vasodilatação que reduzem a pós-carga cardíaca. Os bloqueadores dos canais de cálcio dos canais do tipo L possuem um efeito inotrópico negativo, enquanto os bloqueadores dos canais do tipo T não possuem este efeito devido à baixa densidade deste canal no ventrículo. Alguns agentes desta classe também podem ter efeitos cronotrópicos negativos agindo na condução atrioventricular. Clinicamente, estes agentes reduzem a resistência vascular periférica e coronariana e, assim, aumentam o fluxo sanguíneo coronariano. Estes são tão efetivos quanto os β-bloqueadores ou os diuréticos no tratamento da HAS leve à moderada. No estudo NORDIL, o diltiazem, um agente não-diidropiridínico, foi tão efetivo quanto os diuréticos, β-bloqueadores, ou ambos

em prevenir eventos cardiovasculares como isquemia, infarto miocárdico e outras mortes cardiovasculares (133). As diidropiridinas, como a nifedipina, são efetivos na redução da PA e da morbi-mortalidade cardiovascular (60).

A disfunção endotelial está claramente envolvida na patogênese das doenças cardiovasculares relacionadas à HAS. Os bloqueadores dos canais de cálcio têm mostrado um aumento dos efeitos do NO e uma diminuição da endotelina 1 (ET-1) nas células de músculo liso vascular, melhorando a função endotelial. Este fenômeno pode estar relacionado às propriedades antioxidantes de alguns destes agentes como a amlodipina ou a nisoldipina (48).

Os antagonistas de cálcio mostraram aumentar a densidade microvascular em diversos modelos animais. A nifedipina e a amlodipina aumentam os níveis de VEGF e, portanto, induzem à formação do tubo capilar de células endoteliais arteriais coronarianas (precursor dos novos vasos em formação) humanas *in vitro* (159) e aumentam a densidade capilar total no coração de hamster com cardiomiopatia dilatada (169). Além disso, a nifedipina, a nimodipina e o verapamil mostraram aumento na densidade vascular na membrana corioalantóica de galinha (170). Em SHR, a nifedipina induziu o crescimento da rede capilar coronariana (95); e em ratos Goldblatt hipertensos 2-rins, 1-clipe, o antagonista de canais de cálcio de longa ação, benidipina, aumentou a densidade de capilares e reduziu a razão parede-luz das arteríolas no ventrículo esquerdo (72). Similarmente, o tratamento crônico com verapamil em ratos hipertensos por bloqueio de NO, através do inibidor da óxido nítrico sintase L-NAME, resultou em angiogênese dos vasos do miocárdio, superando o tratamento com o diurético espironolactona e com o iECA enalapril (171). Em ratos com falência cardíaca congestiva induzida pela administração de isoproterenol, a administração de nifedipina foi tão eficaz quanto o antagonista do receptor AT<sub>1</sub> candersatan em aumentar a densidade capilar do ventrículo esquerdo (172). Finalmente, o uso de nifedipina foi capaz de atenuar os danos musculares causados pelo exercício excêntrico, em especial levando ao aumento da relação capilar/fibra no músculo esquelético soleus (173).

No entanto, estes resultados ainda são inconclusivos e controversos, já que alguns estudos não reportam efeitos pró-angiogênicos desta classe de anti-hipertensivos na microcirculação. O mibefradil e o bloqueador de canal de cloreto NPPB [5-nitro 2-(3-fenilpropilamino) benzoato] inibiram a formação de tubo de células endoteliais microvasculares de ratos (174). Na comparação da hiperemia reativa em pacientes hipertensos tratados com diversas classes de anti-hipertensivos. O uso crônico de antagonistas de cálcio não modificou o fluxo sanguíneo de membro superior máximo após a hiperemia reativa gerada pela administração sublingual de nitroglicerina (142). Além disso, a administração crônica de nifedipina a ratos parcialmente nefrectomizados não foi capaz de reverter a

redução da densidade de comprimento de capilares intra-miocárdica. Sendo que este fármaco teve efeito apenas parcial e menor do que aquele gerado pela moxonidina (um agente anti-hipertensivo de ação central) sobre a reversão do aumento da densidade de volume intersticial cardíaca (175).

### **1.8 – Caracterização do Problema**

Considera-se atualmente que a elevação crônica da resistência vascular sistêmica como a principal alteração hemodinâmica na HAS estabelecida. Neste contexto, é importante ressaltar que o aumento da resistência vascular na hipertensão arterial é determinado essencialmente na microcirculação, resultando tanto de alterações funcionais (modificações da reatividade vascular) quanto estruturais (aumento da secção transversal da parede do vaso). Diversos estudos clínicos e experimentais também sugerem que a redução da densidade arteriolar e capilar por volume de tecido (rarefação) contribuem de maneira significativa para a elevação da resistência vascular e em consequência da PA na doença hipertensiva.

Apesar dos importantes e crescentes avanços no diagnóstico e tratamento da doença hipertensiva, assim como na prevenção de lesões de órgãos-alvo (acidente vascular cerebral, doença cardíaca e renal), a hipertensão arterial continua sendo uma das principais causas de morbi-mortalidade mundial. Portanto, além da capacidade de induzir redução significativa dos níveis pressóricos - que parece ser similar entre as diferentes classes de agentes farmacológicos utilizadas no tratamento da hipertensão arterial - a terapia anti-hipertensiva deveria ter como alvo privilegiado a prevenção e/ou reversão das modificações funcionais e estruturais da microcirculação. Assim, estes efeitos farmacológicos sobre a microcirculação devem ser profundamente analisados e diferenciados entre as classes de anti-hipertensivos utilizadas clinicamente.



## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo Geral

Investigar os efeitos do tratamento crônico com fármacos anti-hipertensivos de diferentes classes farmacológicas sobre a densidade capilar cutânea, muscular esquelética e do ventrículo esquerdo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

### 2.2 – Objetivos Específicos

- ❖ Investigar a densidade capilar funcional de SHR na pele e no músculo esquelético;
- ❖ Investigar a densidade capilar estrutural de SHR no músculo esquelético e no ventrículo esquerdo;
- ❖ Investigar os efeitos do tratamento crônico com um  $\beta$ -bloqueador (atenolol), com um inibidor da enzima conversora de angiotensina (enalapril), com um antagonista dos receptores AT<sub>1</sub> (losatan) e com um bloqueador dos canais de cálcio (nifedipina), sobre a densidade capilar funcional e/ou estrutural na pele, no músculo esquelético e no miocárdio de SHR;
- ❖ Correlacionar os dados de densidade capilar funcional na pele e no músculo esquelético de SHR.



### **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 - Modelos Animais**

Foram utilizados ratos machos SHR da linhagem de Okamoto (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil) com 12 a 14 semanas e ratos machos normotensos Wistar Kyoto (WKY, Biotério da Fundação Oswaldo Cruz, Brasil), com idades pareadas.

Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (ciclos de 12-12h claro-escuro) e temperatura ( $22 \pm 1$  °C) com acesso livre a água e ração padrão até o dia do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo número P 0350-07).

Cinquenta ratos SHR foram divididos de maneira aleatória em 5 grupos de animais (10 animais por grupo) e tratados durante 28 dias por gavagem com veículo (água destilada) (SHR + VEI, grupo controle), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia). Um grupo de 10 ratos WKY foi tratado com veículo durante 28 dias e foi considerado como o grupo controle normotenso (WKY + VEI).

#### **3.2 - Medidas Hemodinâmicas**

Foram realizadas medidas da PA sistólica (PAS), da PA diastólica (PAD) em animais conscientes, através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, Visitech blood pressure analysis system, USA), considerado um método indireto de medida da PA. A partir destas medidas este sistema calcula a PA média (PAM) destes animais.

Assim, pelo menos uma semana antes da medida da PA, os ratos foram adaptados por 3 dias consecutivos neste aparelho de pressão caudal pré-aquecido para a aclimação ao procedimento experimental. Após o início dos tratamentos farmacológicos, a PA era medida uma vez por semana, sendo adquiridas 15 medidas individuais por animal e utilizadas a média destas medidas.

#### **3.3 - Microscopia Intravital por Fluorescência**

Na manhã dos experimentos terminais, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (75 mg/kg) administrado por via intraperitoneal; a anestesia foi complementada por aplicações intravenosas de 5 mg/kg de pentobarbital imediatamente antes da administração do agente bloqueador neuromuscular. Os ratos foram intubados através de

traqueostomia com cânula de polietileno, imobilizados com brometo de pancurônio (1 mg/kg, i.v.) e artificialmente ventilados com ar ambiente através de um ventilador para animais de pequeno porte (Ugo Basile, Model 7025, Biological Research Apparatus, Varese, Italy) com volume respiratório de 1,5 mL e frequência respiratória 50 incursões/min. A veia jugular foi cateterizada para permitir a administração de drogas e marcadores fluorescentes para a microscopia intravital, enquanto que a PA e a frequência cardíaca foram continuamente monitoradas através de um cateter inserido na artéria carótida direita. A temperatura central dos animais foi monitorada com o auxílio de uma sonda retal e mantida a  $38 \pm 0,5$  °C através de um sistema de aquecimento homeotérmico (Harvard Apparatus, Boston, MA, USA).

Na avaliação da microcirculação do músculo esquelético, uma incisão mediana foi feita na pele da pata esquerda assim como na fáscia ventral da coxa, permitindo a visualização do músculo grácil. O músculo foi então colocado sob o microscópio protegido com uma capa plástica, de modo que permanecesse fixado sob o feixe de luz.

Para a avaliação da microcirculação cutânea, a pele da orelha foi raspada para a remoção dos pêlos e coberta com uma capa plástica impermeável ao oxigênio. A seguir, os animais foram colocados sob o microscópio, de modo que a orelha permanecesse fixada sob o feixe de luz.

Utilizou-se um microscópio intravital de base fixa (Olympus BX51/WI, USA) acoplado a um sistema de câmera de vídeo digital (Optronics, Goleta, CA, USA). Foi utilizada uma objetiva Olympus 10x nos experimentos produzindo um aumento final de 100x no monitor. Após a administração i.v. de 0,15 mL de fluoresceína-isotiocianato (FITC)-dextran a 5% (peso molecular de 150.000), as imagens da microcirculação do músculo e pele foram obtidas sucessivamente para contagem em tempo real dos capilares com o auxílio do *software* Saisam 5.1.3 (Microvision, France).

Assim, inicialmente, foi obtida aleatoriamente uma imagem do músculo esquelético que permitisse a perfeita visualização de capilares perfundidos. Nesta imagem, foi delimitado um campo microscópico equivalente a  $1 \text{ mm}^2$  e, nesta área, foram contados todos os capilares espontaneamente perfundidos durante um período de 4 minutos. Foram considerados capilares perfundidos apenas os vasos que permitissem o fluxo contínuo e unitário de hemácias pelo vaso. Além disso, toda vez que ocorresse a ramificação do capilar, os vasos originados desta ramificação eram considerados como sendo novos capilares. O valor total de capilares contados foi considerado como sendo a densidade capilar funcional muscular esquelética. Após a contagem, eram feitas 4 fotos representativas do campo microscópico utilizado, através do *software* Archimed 3.7.0 (Microvision, France).

Após a contagem e a obtenção das fotos dos capilares do músculo esquelético, foi obtida aleatoriamente uma imagem da pele da orelha que permitisse a perfeita visualização de capilares perfundidos. O protocolo acima descrito para o músculo esquelético foi seguido para a determinação da densidade capilar funcional cutânea. Da mesma forma, foram obtidas 4 imagens representativas do campo microscópico utilizado na contagem. Após o experimento, o ventrículo esquerdo e o músculo grácil foram imediatamente dissecados e colocados em solução de paraformaldeído a 4% para análises morfológicas.

### 3.4 - Análise Histológica

As amostras de tecido (ventrículo esquerdo e músculo grácil) foram desidratadas através de uma série graduada de etanol (70, 95 e 100 %) e embocadas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5  $\mu\text{m}$  com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2125, Germany). A seguir, o material foi marcado com uma lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada a FITC, que permite a identificação de células endoteliais, a uma diluição de 1:20 em um ambiente escuro à temperatura ambiente por 30 min.

As lectinas são proteínas, geralmente derivadas de plantas, que mostram ligação reversível e seletiva para sacarídeos terminais. Para fins histoquímicos as lectinas podem ser utilizadas como um marcador visível, com derivados de peroxidase ou com marcadores fluorescentes, como derivados de fluoresceína ou de rodamina. Hansen-Smith et al. (176) mostraram que as células endoteliais de diversas espécies de mamíferos ligam as lectinas GSI e GSI-B<sub>4</sub>. Porém, diferentes graus de ligação são observados entre a porção arterial e venosa dos vasos, com uma redução marcante dos sítios de ligação para as vênulas. Além disso, este estudo mostrou que a GSI marcou significativamente mais capilares e arteríolas terminais do que técnicas histoquímicas como a medida da atividade da fosfatase alcalina. Essas observações sugerem que a lectina GSI pode ser extremamente útil como um marcador para a microcirculação de músculo esquelético em muitos tipos de experimentos fisiológicos.

A densidade capilar estrutural (número de capilares por  $\text{mm}^2$ ) e a densidade de fibras (número de fibras musculares por  $\text{mm}^2$ ) foram identificadas e analisadas usando o *software* Saisam e o microscópio confocal (Olympus BX51 and Fluoview SV 300 scanning unit, Olympus, USA) com uma objetiva 20x e um aumento total de 200x no monitor. A densidade capilar estrutural do músculo esquelético (músculo grácil) foi avaliada utilizando pelo menos 12 campos microscópicos de seções teciduais aleatoriamente selecionadas. A relação capilar/fibra foi calculada pela razão entre a densidade capilar e a densidade de fibras e foi considerado como um índice anatômico de angiogênese.

A densidade capilar do ventrículo esquerdo foi determinada utilizando o método orientador (177). Brevemente, este método descreve uma aproximação para se gerar cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (AUI) de espécies biológicas que permite o estudo quantitativo de estruturas anisotrópicas tridimensionais em seções bidimensionais. O miocárdio é uma estrutura anisotrópica, onde há uma orientação definida na apresentação do material, porém seções isotrópicas, com estrutura homogênea, são necessárias para estudos estereológicos. Segundo este método, um fragmento de tecido (ou órgão) deve ser seccionado em dois cortes consecutivos. O primeiro corte deve ser realizado num ângulo determinado aleatoriamente. A seguir, a face de corte deve ser apoiada num plano e novamente o tecido deve ser seccionado segundo um ângulo aleatório. Assim, pode-se admitir que os fragmentos obtidos contêm tecido de modo isotrópico, mas o procedimento pode ser repetido outras vezes para maior segurança nos casos em que o material for altamente anisotrópico.

Neste trabalho, foram utilizados pelo menos 3 planos de corte para se gerar uma estrutura isotrópica no miocárdio. A estimativa da densidade de volume de capilares ( $V_{v[\text{cap}]}$ ) e da densidade de volume de fibras ( $V_{v[\text{fib}]}$ ) foi determinada utilizando o método do “intercepto do ponto-amostrado” anteriormente descrito por Gundersen & Jensen (178) para tecidos AUI. Neste procedimento, pelo menos 7 campos microscópicos de três seções do tecido para cada animal e dez animais por grupo foram aleatoriamente analisados (210 campos por grupo). Um sistema-teste consistindo de linhas paralelas associadas com 56 pontos-teste foi superposto em cada campo microscópico, com o auxílio do *software* Saisam 5.1.3.

A densidade de volume de capilares ( $V_{v[\text{cap}]}$ ) foi calculada da seguinte forma:  $V_{v[\text{cap}]} = P_p / P_T$  (%), onde  $P_p$  é o número de pontos-teste que superpõem capilares e  $P_T$  é o número total de pontos-teste ( $P_T = 56$  neste caso). A densidade de volume de fibras foi calculada de forma similar. A razão entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras ( $V_{v[\text{cap}]} / V_{v[\text{fib}]}$ ) foi então diretamente calculada.

O número total de pontos analisados por grupo foi de 3920, ou seja, 7 campos microscópicos de três seções do tecido para cada animal e dez animais por grupo, utilizando um sistema-teste com 56 pontos. Hally et al. mostrou que podemos utilizar a seguinte fórmula para avaliarmos se o tamanho da amostra em um estudo estereológico deste tipo está adequado (100):

$$\text{EPR} = \sqrt{\frac{(1 - V_v)}{n}}$$

Sendo:

EPR – Erro padrão relativo

$V_v$  – densidade de volume da estrutura em análise

n – número de pontos a serem contados

Considerando-se que em bioestatística frequentemente apresenta-se o índice de significância  $\alpha$  de 0,05 (probabilidade = 95%), podemos atribuir este valor ao EPR. Além disso, o Vv médio de todos os capilares dos grupos analisados foi igual a 0,33 (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Densidade de volume de capilares

Grupos de Animais (n = 10)	Densidade de volume de capilares média após 28 dias de tratamento
WKY + VEI	0,35
SHR + VEI	0,29
SHR + ATE	0,29
SHR + ENA	0,37
SHR + LOS	0,37
SHR + NIF	0,30
Média de todos os grupos	0,33

Densidade de volume de capilares média (n = 10) no ventrículo esquerdo de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Assim temos:

$$0,05 = \sqrt{\frac{(1 - 0,33)}{n}} \quad \text{logo,}$$

$$n = 268$$

Posto que o Vv = 0,33, este só ocupa 33% do tecido, por isso o resultado encontrado n = 268 deve ser corrigido para o Vv de nosso material, assim:

$$n_{\text{corrigido}} = \frac{n_{\text{calculado}}}{Vv} \quad \text{logo,}$$

$$n_{\text{corrigido}} = 812$$

Ou seja, o mínimo de pontos a serem contados em nossa amostra deve ser 812. Assim, o número de pontos contados (n = 3920) supera bastante este mínimo, sendo considerado adequado para o nosso estudo.

### 3.5 - Análise Estatística

Os resultados foram expressos como sendo a Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) para cada grupo e comparações entre grupos diferentes foram feitas através da análise de variância (ANOVA). A normalidade de distribuição dos dados foi obtida através do teste de Kolmogorov–Smirnov. Quando foram detectadas diferenças significativas pelo ANOVA, o

teste de Bonferroni foi utilizado para localizar as diferenças estatisticamente significativas. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para medir a força da relação linear entre a densidade capilar funcional na pele e no músculo esquelético. Diferenças com valores de  $p$  menores que 0,05 foram consideradas significativas. Todos os cálculos foram realizados por análises informatizadas através do programa estatístico comercialmente disponível (Graphpad Instat e Graphpad Prism, Graphpad Software, University of London, UK).

### **3.6 - Drogas**

As seguintes drogas foram utilizadas: pentobarbital sódico, nifedipina, losartan, enalapril, atenolol, FITC-dextran e FITC conjugado a lectina *Griffonia simplicifolia* I, adquiridas da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA e o brometo de pancurônio foi adquirido da Cristália, Brasil.



## 4 – RESULTADOS

### 4.1 - Efeitos dos Tratamentos na PA

No início dos tratamentos, os diferentes grupos de animais SHR apresentavam valores de PAS, PAD e PAM significativamente aumentados quando comparados com o grupo controle normotenso (WKY + VEI). Além disso, não foi verificada nenhuma diferença significativa nos valores basais de PAS, PAM e PAD nos diferentes grupos de SHR. A Tabela 4.3 mostra os valores médios de PAS, PAM e PAD nos diferentes grupos de animais estudados no início do experimento.

Tabela 4.3 – PA Basal (antes do tratamento)

Grupo	PAS		PAD		PAM	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
WKY + VEI	132	3	83	1	97	1
SHR + VEI	189	6	146	6	158	6
SHR + ATE	196	5	156	6	171	5
SHR + ENA	204	6	162	5	174	5
SHR + LOS	179	5	138	6	147	5
SHR + NIF	180	3	141	3	155	3

PA sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) basal (antes do tratamento oral) nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos posteriormente tratados com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia) (n = 10).

O tratamento oral crônico de SHR durante 4 semanas com as diferentes drogas anti-hipertensivas estudadas foi capaz de reduzir os valores médios da PAS quando comparados com os valores basais de PAS (início do tratamento) destes animais. Já o tratamento dos ratos WKY e de SHR com veículo resultou na manutenção dos valores médios de PAS nestes grupos, observados no início do experimento (Figura 4.2).

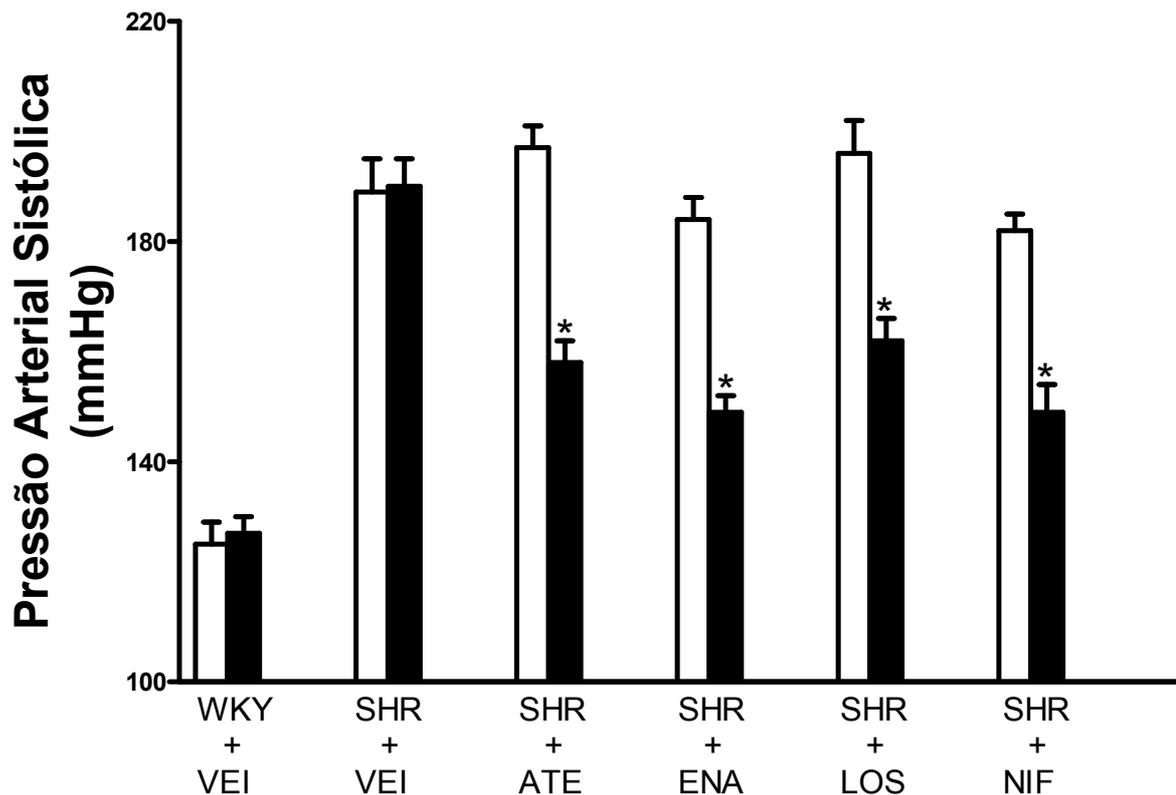


Figura 4.2 – PA sistólica antes (barras abertas) e após (barras fechadas) tratamento oral durante 28 dias em ratos hipertensos tratados com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 experimentos.

\*  $p < 0,05$  vs. valores basais.

Após 4 semanas de tratamento oral, a administração das drogas anti-hipertensivas induziu a diminuição de mesma magnitude da PAS, PAD e PAM nos diferentes grupos de tratamento, quando comparados com o grupo SHR controle. Apesar disso, estes animais apresentavam valores de PAS, PAD e PAM significativamente aumentados quando comparados com o grupo controle normotenso (WKY + VEI). A Tabela 4.4 mostra os valores médios de PAS, PAM e PAD nos diferentes grupos de animais estudados no final do experimento.

Tabela 4.4 - Efeitos dos Tratamentos na PA (após o tratamento)

Grupo	PAS		PAD		PAM	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
WKY + VEI	119	4	83	2	97	1
SHR + VEI	192	4	154	4	165	3
SHR + ATE	161	4	121	6	134	5
SHR + ENA	154	3	112	4	126	4
SHR + LOS	149	3	99	5	113	5
SHR + NIF	149	4	111	5	124	5

PA sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) no final do tratamento crônico nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia) (n = 10).

A administração das drogas anti-hipertensivas gerou diferentes perfis de redução da PAS, PAD e PAM nos diferentes grupos de tratamento ao longo das 4 semanas de tratamento (figuras 4.3, 4.4 e 4.5). Apesar disso, no início do tratamento todos os grupos de SHR apresentavam mesma magnitude da PAS, PAD e PAM e, no fim do tratamento, os animais tratados farmacologicamente apresentavam valores de PAS, PAD e PAM reduzidos de forma similar quando comparados com o grupo controle hipertenso (SHR + VEI).

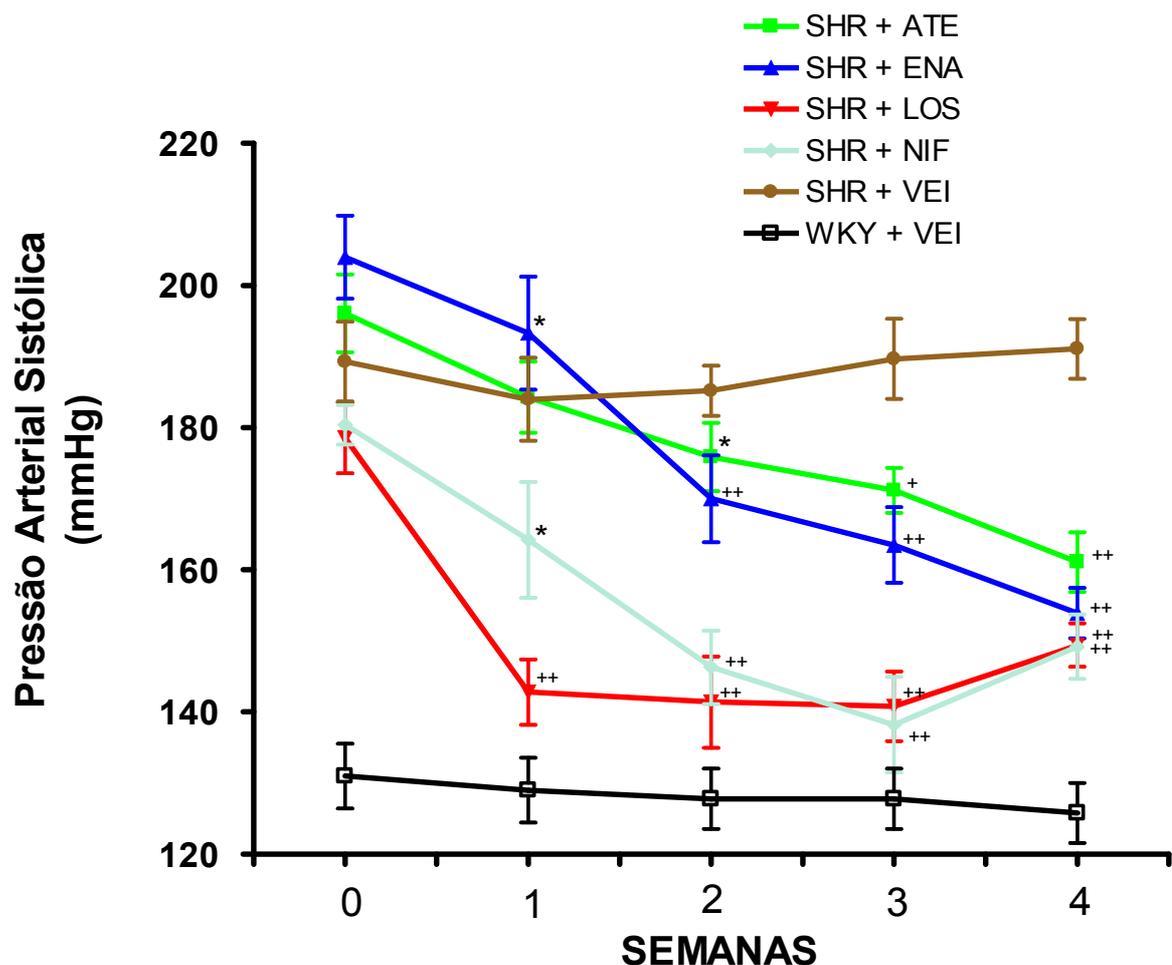


Figura 4.3 – PA sistólica durante o tratamento crônico nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 experimentos.

\*  $p < 0,05$  vs. grupo SHR + VEI.

\*\*  $p < 0,01$  vs. grupo SHR + VEI.

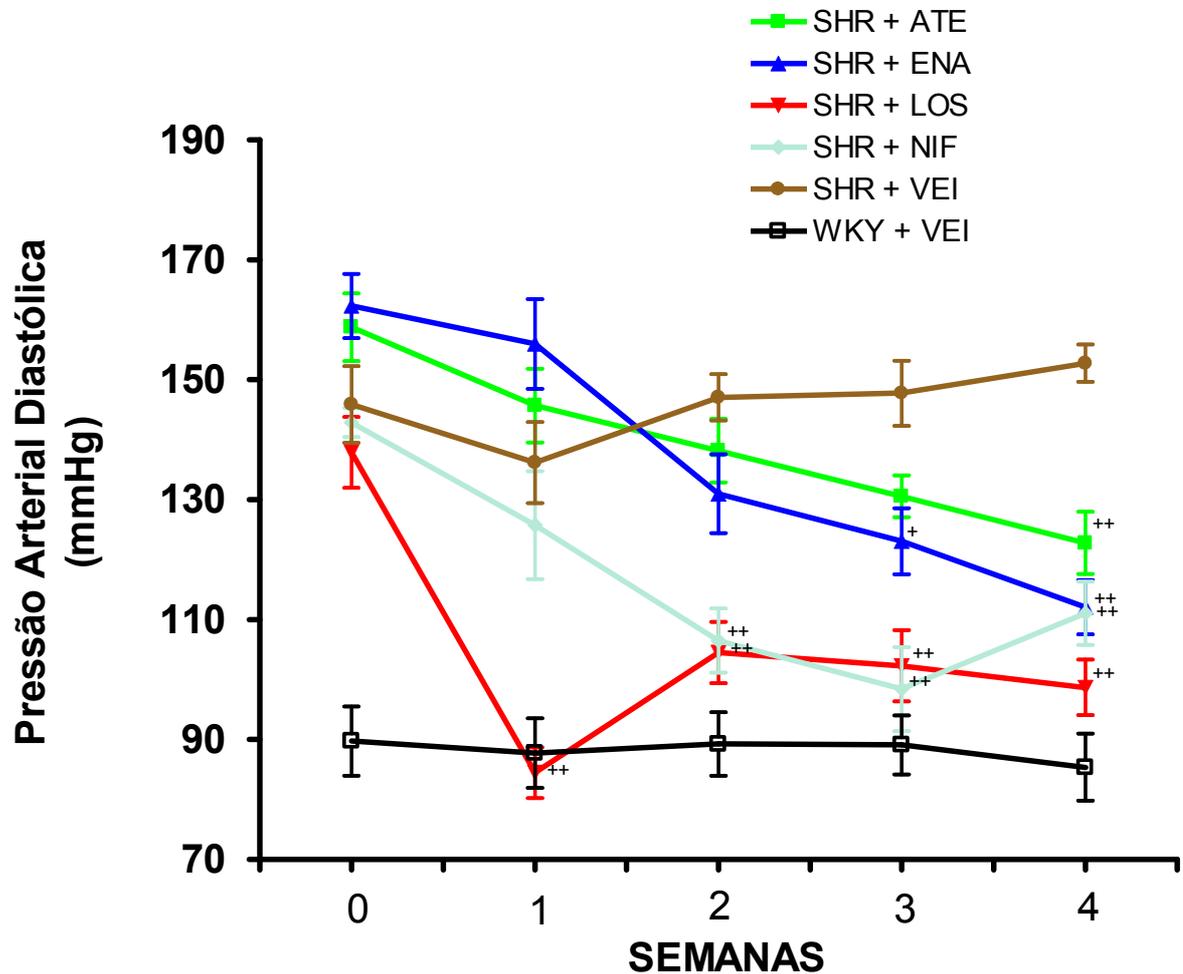


Figura 4.4 – PA diastólica durante o tratamento crônico nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 experimentos.

<sup>+</sup>  $p < 0,05$  vs. grupo SHR + VEI.

<sup>++</sup>  $p < 0,01$  vs. grupo SHR + VEI.

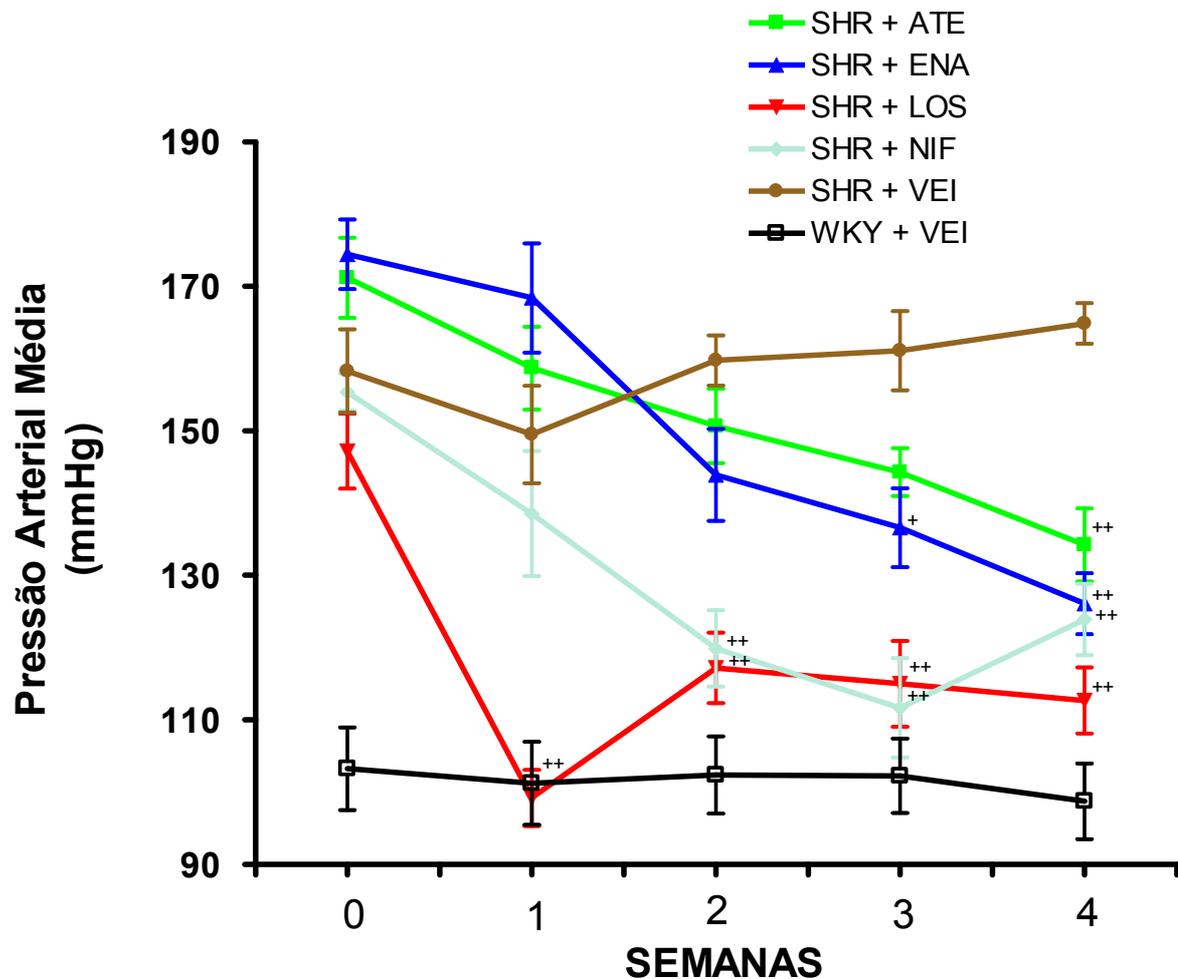


Figura 4.5 – PA média durante o tratamento crônico nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 experimentos.

<sup>+</sup>  $p < 0,05$  vs. grupo SHR + VEI.

<sup>++</sup>  $p < 0,01$  vs. grupo SHR + VEI.

#### 4.2 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Funcional do Músculo Esquelético e da Pele

Através da videomicroscopia fluorescente intravital, foi possível a identificação da rede de capilares nos tecidos muscular esquelético e pele. No músculo esquelético, os capilares estão arranjados ao longo do eixo longitudinal das fibras musculares, em direções paralelas entre si. Na pele, os capilares estão arranjados em redes que se interconectam e as alças capilares são orientadas perpendicularmente à superfície da pele. Estas estruturas estão mostradas abaixo em imagens representativas da videomicroscopia intravital da pele e do músculo grácil após a administração intravenosa de fluoresceína-isotiocianato (FITC) dextran (peso molecular 150.000), que permite a visualização e a contagem dos capilares nestes leitos vasculares (Figura 4.6).

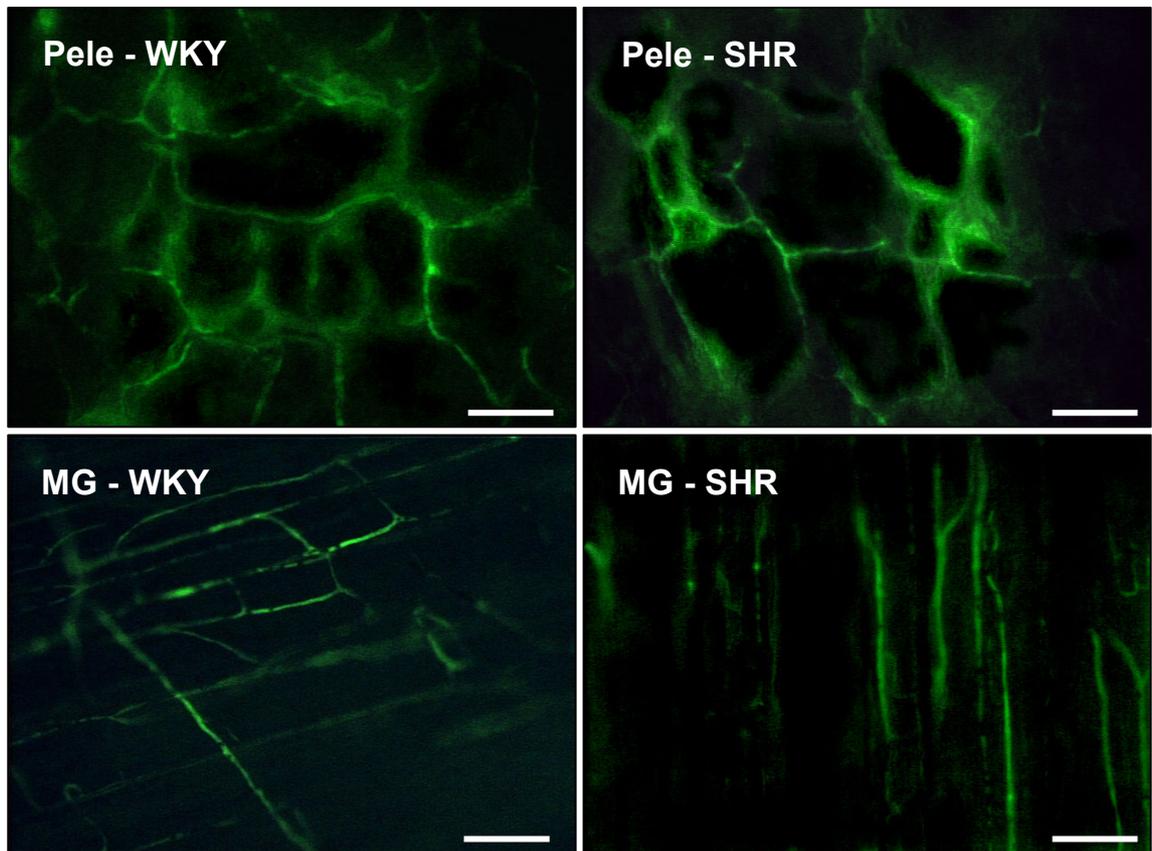


Figura 4.6 – Imagens representativas da videomicroscopia intravital da pele e do músculo grácil (MG) de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos (SHR + VEI) após a administração intravenosa de fluoresceína-isotiocianato (FITC) dextran (peso molecular 150.000), indicando os capilares. Aumento de 100×, barra = 100  $\mu$ m.

Quando comparados com os animais normotensos, o grupo SHR controle mostrou uma densidade capilar funcional significativamente menor tanto no músculo esquelético (WKY + VEI  $395 \pm 17$  e SHR + VEI  $258 \pm 13$  capilares/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ ) (Tabela 4.5) quanto na pele (WKY + VEI  $391 \pm 18$  e SHR + VEI  $210 \pm 15$  capilares/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ ) evidenciando a rarefação capilar funcional característica deste grupo de animais (Tabela 4.5).

Os tratamentos com losartan e nifedipina aumentaram significativamente a densidade capilar no músculo grácil e na pele dos animais SHR. Além disso, estes tratamentos também foram capazes de reverter a rarefação capilar funcional nestes animais, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os grupos SHR + LOS e SHR + NIF e o grupo de animais normotensos (WKY + VEI) ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4.5 e Figura 4.7).

O tratamento com enalapril aumentou significativamente a densidade capilar apenas na pele de SHR, mas a rarefação capilar não foi completamente revertida, já que este grupo de animais apresentou diferença significativa em relação ao grupo de animais normotensos (WKY + VEI  $391 \pm 18$  e SHR + ENA  $285 \pm 9$ ,  $p < 0,01$ ). Por outro lado, a rarefação capilar funcional no músculo esquelético de SHR não foi alterada pelo tratamento com este inibidor da enzima conversora de angiotensina ( $p > 0,05$ ).

O tratamento com atenolol não provocou nenhuma alteração na densidade capilar de SHR tanto no músculo esquelético quanto na pele, não sendo capaz de promover modificações na rarefação capilar funcional em SHR ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4.5 e Figura 4.7).

Tabela 4.5 – Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Funcional

Grupo	Músculo Esquelético		Pele da Orelha	
	Média	EPM	Média	EPM
WKY + VEI	395	18	391	18
SHR + VEI	258	13	210	15
SHR + ATE	302	15	269	16
SHR + ENA	285	9	283	16
SHR + LOS	421	17	391	23
SHR + NIF	434	24	397	29

Densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele da orelha de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia) (n = 10).

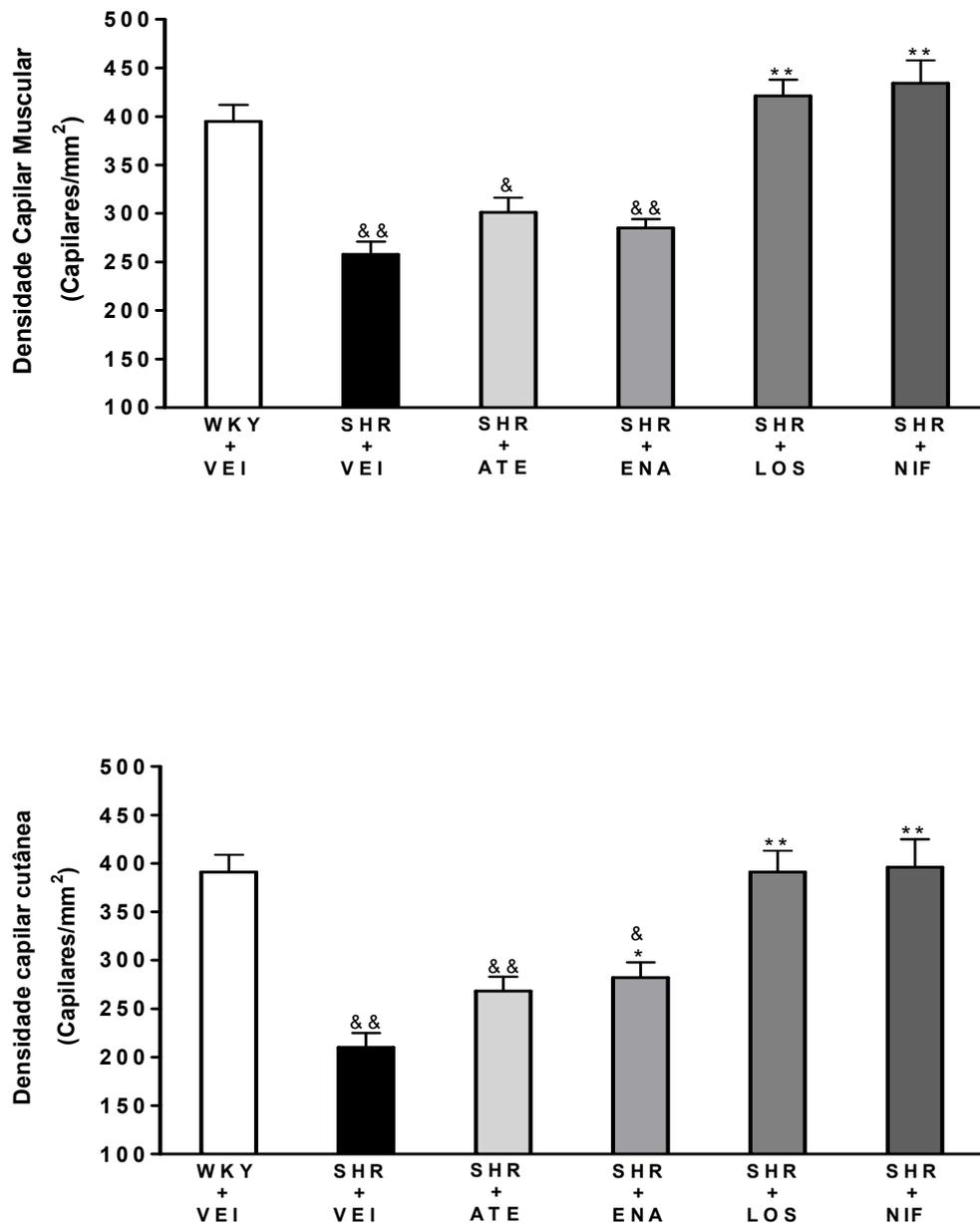


Figura 4.7 – Densidade capilar funcional no músculo esquelético (painel superior) e pele (painel inferior) de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Os valores representam uma média  $\pm$  EPM de 10 experimentos.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$  vs. grupo SHR + VEI.

&  $p < 0.01$  &&  $p < 0.001$  vs. grupo WKY + VEI.

### 4.3 - Correlação entre a Densidade Capilar Funcional no Músculo e na Pele

Os resultados semelhantes de densidade capilar funcional obtidos em leitos vasculares distintos (músculo esquelético e pele da orelha) nos diferentes grupos de animais estudados suscitaram a possibilidade de uma relação linear entre estes resultados.

A figura 4.8 mostra a existência de uma correlação linear entre a densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele, incluindo animais normotensos, bem como animais hipertensos tratados com antihipertensivos ou veículo (coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0,654$ ,  $n = 60$ ,  $p < 0,0001$ ).

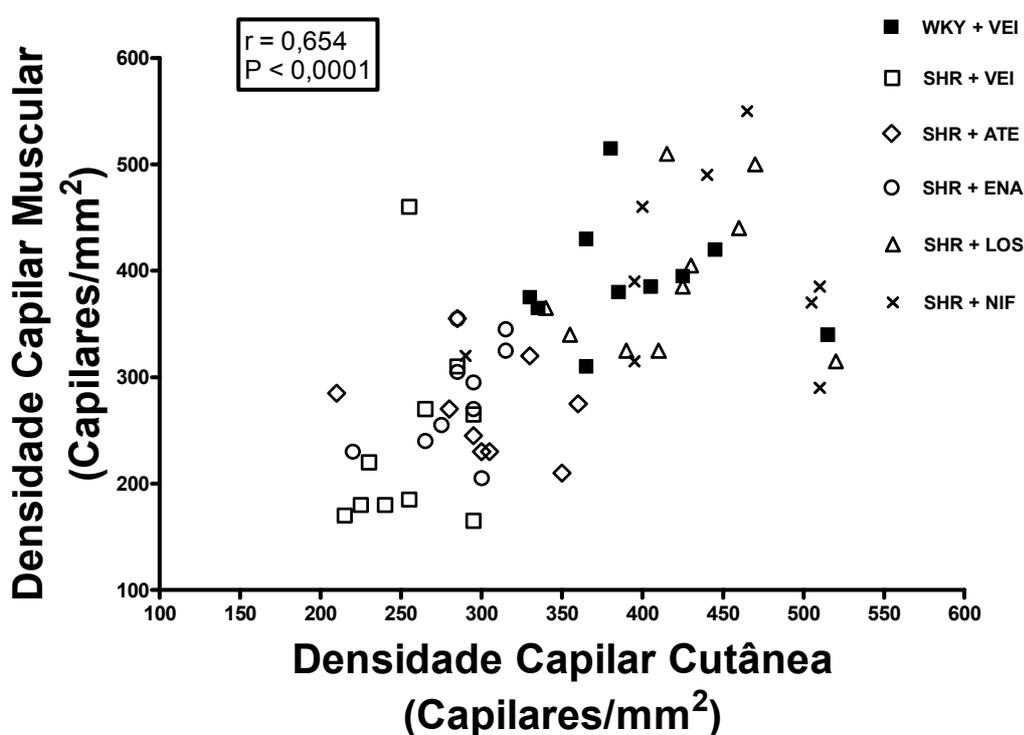


Figura 4.8 – Correlação entre a densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

#### 4.4 - Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Esquelético e do Ventrículo Esquerdo

A figura 4.9 mostra exemplos representativos de fotomicrografias utilizadas na avaliação histológica da densidade capilar estrutural com FITC-conjugado ao marcador lectina *Griffonia simplicifolia*. As características da rede capilar do músculo esquelético em seções transversais podem ser observadas em (A). No ventrículo esquerdo, a densidade capilar estrutural foi avaliada em seções obtidas utilizando o método “orientator”, que permite a visualização de estruturas aleatórias e uniformemente isotrópicas em tecidos anisotrópicos como o coração (B).

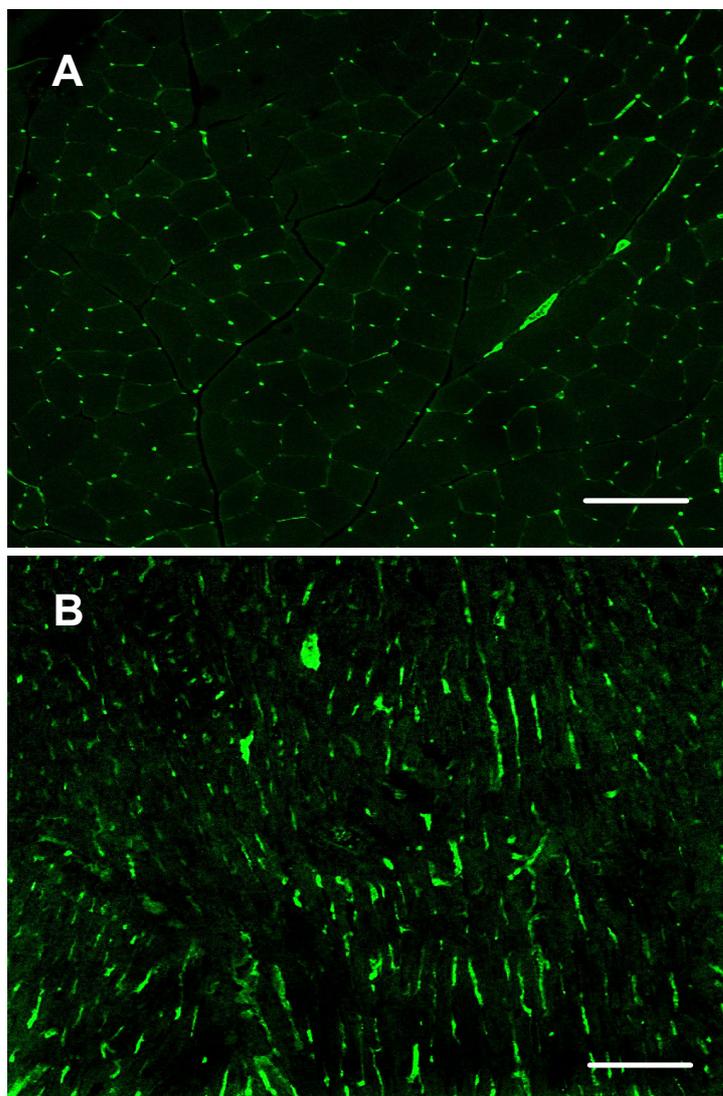


Figura 4.9 – Exemplos representativos de fotomicrografias adquiridas utilizando microscopia fluorescente confocal utilizada na avaliação histológica da densidade capilar estrutural com FITC-conjugado ao marcador lectina *Griffonia simplicifolia*. O arranjo anatômico da rede capilar do músculo esquelético em seções transversais pode ser observado em (A). No ventrículo esquerdo, a densidade capilar estrutural foi avaliada em seções obtidas utilizando o método “orientator”, que permite a visualização de estruturas aleatórias e uniformemente isotrópicas em tecidos anisotrópicos como o coração (B). Aumento 200×, barra = 100µm.

Quando comparado com o grupo de animais normotensos, o grupo controle SHR mostrou uma diminuição significativa na relação capilar/fibra no músculo esquelético (WKY + VEI  $1,74 \pm 0,08$  e SHR + VEI  $1,40 \pm 0,06$  capilar/fibra muscular,  $p < 0,01$ ), evidenciando a rarefação capilar estrutural característica deste grupo de animais (Tabela 4.6).

Os tratamentos com ENA, LOS e NIF aumentaram significativamente a relação capilar/fibra no músculo grácil dos animais SHR. Além disso, estes tratamentos também foram capazes de reverter a rarefação capilar estrutural no músculo esquelético destes animais, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os grupos SHR + ENA, SHR + LOS e SHR + NIF e o grupo de animais normotensos (WKY + VEI) ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4.6 e Figura 4.10).

Por outro lado, o tratamento com atenolol não provocou nenhuma alteração na relação capilar/fibra de SHR tanto no músculo esquelético quanto na pele, não sendo capaz de promover modificações na rarefação capilar estrutural no músculo esquelético em SHR ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4.6 e Figura 4.10).

Tabela 4.6 – Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural Muscular Esquelética

Grupo	Relação capilar/fibra no músculo esquelético	
	Média	EPM
WKY + VEI	1,74	0,09
SHR + VEI	1,42	0,06
SHR + ATE	1,48	0,03
SHR + ENA	1,65	0,04
SHR + LOS	1,80	0,07
SHR + NIF	1,77	0,09

Relação capilar/fibra no músculo esquelético de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia) ( $n = 10$ ).

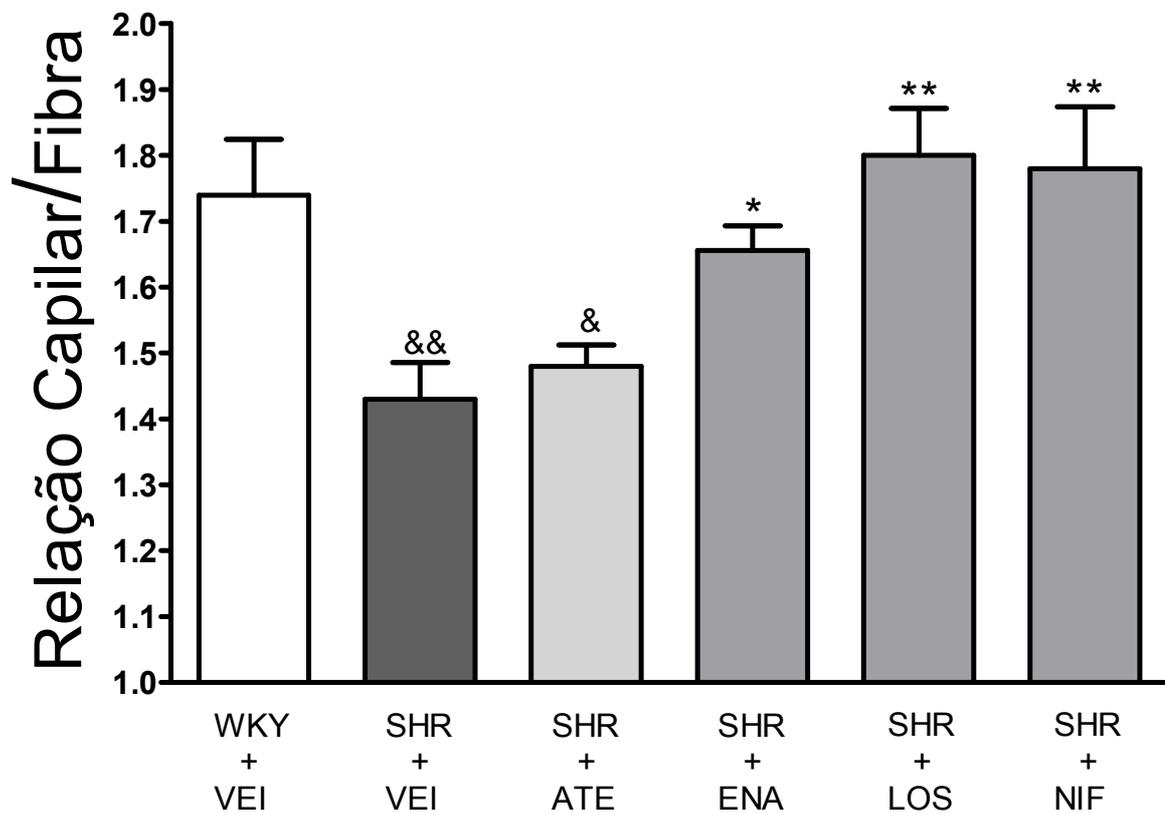


Figura 4.10 – Relação capilar/fibra no músculo esquelético de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Os valores representam a média ± EPM de 10 experimentos.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  vs. grupo SHR + VEI.

&  $p < 0,05$ , &&  $p < 0,01$  vs. grupo WKY + VEI.

A relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras ( $Vv[cap]/Vv[fib]$ ) no ventrículo esquerdo dos animais SHR estava significativamente reduzida quando comparada com o grupo de animais controle normotenso (WKY + VEI  $0,55 \pm 0,09$  and SHR + VEI  $0,42 \pm 0,09$ ,  $p < 0,01$ ), evidenciando a rarefação capilar estrutural característica deste grupo de animais (Tabela 4.7).

Os tratamentos com ENA e LOS aumentaram significativamente a  $Vv[cap]/Vv[fib]$  no ventrículo esquerdo dos animais SHR. Além disso, estes tratamentos também foram capazes de reverter a rarefação capilar estrutural no ventrículo esquerdo destes animais, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os grupos SHR + ENA e SHR + LOS e o grupo de animais normotensos (WKY + VEI) ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4.7 e Figura 4.11).

Por outro lado, o tratamento com ATE e NIF não provocou nenhuma alteração na  $Vv[cap]/Vv[fib]$  no ventrículo esquerdo de SHR, não sendo capaz de promover modificações na rarefação capilar estrutural no ventrículo esquerdo em SHR ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4.7 e Figura 4.11).

Tabela 4.7 – Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Miocárdio

Grupo	Relação ( $Vv[cap]/Vv[fib]$ ) no ventrículo esquerdo	
	Média	EPM
WKY + VEI	0,54	0,03
SHR + VEI	0,42	0,03
SHR + ATE	0,41	0,03
SHR + ENA	0,59	0,03
SHR + LOS	0,59	0,03
SHR + NIF	0,45	0,03

Relação ( $Vv[cap]/Vv[fib]$ ) no ventrículo esquerdo de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

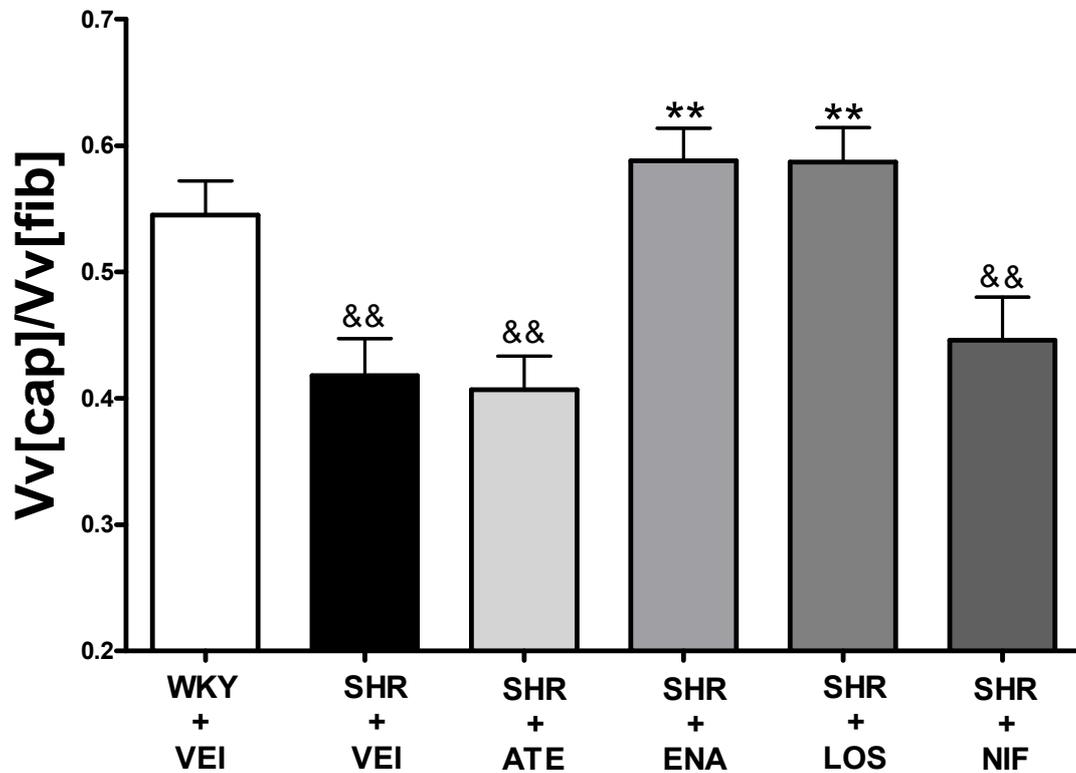


Figura 4.11 – Relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras no ventrículo esquerdo de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), atenolol (SHR + ATE, 50 mg/kg/dia), enalapril (SHR + ENA, 10 mg/kg/dia), losartan (SHR + LOS, 10 mg/kg/dia) ou nifedipina (SHR + NIF, 20 mg/kg/dia).

Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 10 experimentos.

\*\*  $p < 0,001$  vs. grupo SHR + VEI.

&&  $p < 0.01$  vs. grupo WKY + VEI.



## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 – Modelos Animais de Hipertensão

Nos últimos 50 anos foram desenvolvidos diversos modelos animais de hipertensão, principalmente em ratos, dentre estes podemos destacar: SHR, Dahl, acetato de desoxicorticosterona (DOCA)-sal, dois-rins um clipe e TGR(mRen2)<sup>27</sup> transgênico. Neste estudo, foi utilizado ratos SHR como modelo de hipertensão primária, por se tratar do modelo mais próximo desta doença disponível para a pesquisa laboratorial.

A linhagem de SHR foi obtida por Okamoto e Aoki (1963) a partir de ratos Wistar. A pressão desses ratos eleva-se a partir da 5-6 semana de idade e atinge os valores sistólicos de 180-200 mmHg (88).

Em geral, o desenvolvimento de ratos hipertensos homozigóticos é alcançado pela seleção de animais com o fenótipo desejado ao longo de várias gerações e, uma vez que o traço genético é fixado, o mesmo é mantido por cerca de 20 gerações para alcançar uma homogeneidade genética. Esta técnica é utilizada para se desenvolver, a partir de linhagens Wistar, modelos importantes como o SHR (179). Entretanto, o SHR não é uma linhagem estritamente inata e dá margem a uma grande variedade de genes envolvidos que podem mimetizar um subtipo de hipertensão primária humana que é inerente à herança Mendeliana. Os mecanismos genéticos da hipertensão em SHR têm sido atribuídos tanto a alterações neurais quanto vasculares. Variações individuais no histórico genético do SHR podem influenciar a evolução da hipertensão e as lesões de órgãos-alvo nesse modelo. Neste modelo fenotípico, a hipertensão está associada à hipertrofia cardíaca, disfunção endotelial e insuficiência funcional renal (proteinúria, depuração da creatinina diminuída), porém não são observados de forma consistente insuficiência cardíaca e insuficiência renal (88).

Os mecanismos envolvidos na hipertensão dos SHR ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns trabalhos têm demonstrado que a Ang II parece ter um papel importante na promoção da hipertensão nestes ratos, visto que ao tratá-los com inibidores de ECA, há uma redução significativa da PA, bem como uma normalização da função endotelial e uma redução da mortalidade (180, 181).

Em nível vascular, a expressão da eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e da iNOS (óxido nítrico sintase induzida) está aumentada nos SHR em relação aos ratos Wistar, além de elevar-se com a idade (182-184). Embora a eNOS esteja aumentada, aparentemente ela não está acoplada e ativa, uma vez que ao se tratar SHR com BH<sub>4</sub>, um co-fator da NOS, observa-se uma redução na PA (155, 185). O desacoplamento da eNOS junto com o aumento da atividade da xantina oxidase, que é uma enzima responsável pela produção de espécies

reativas de oxigênio, favorecem nos SHR um aumento na produção destas espécies reativas de oxigênio que contribuem para a disfunção endotelial observada nestes animais (24, 185-187).

Este modelo se mostrou o mais adequado para este estudo, que teve como objetivo estudar os efeitos de diferentes fármacos anti-hipertensivos sobre a densidade capilar em um modelo animal de hipertensão primária.

## **5.2 - Efeitos dos Tratamentos na PA**

Inicialmente, verificou-se que a PA dos animais Wistar encontrava-se dentro dos valores esperados para ratos normotensos. Além disso, todos os grupos de animais SHR apresentavam, no início do tratamento, PA elevada, compatível com a de ratos adultos hipertensos, e semelhantes entre os diferentes grupos. Resultados semelhantes foram obtidos nas medidas das pressões arteriais diastólica e média. O valor basal de PAS semelhante entre os grupos de SHR é importante para garantir que os efeitos observados com os tratamentos anti-hipertensivos não tenham sido resultado de uma falta de padronização inicial.

Ao término de 4 semanas de tratamento, verificou-se que os animais tratados com água destilada (grupos controle Wistar e SHR) tiveram suas PA mantidas em relação ao início do tratamento. No entanto, conforme esperado, os tratamentos com os fármacos anti-hipertensivos foram capazes de reduzir a PA dos ratos SHR em relação aos seus valores basais. Além disso, verificou-se que todos os grupos de ratos tratados tiveram uma redução final da PAS semelhante entre eles. Resultados semelhantes foram obtidos nas medidas das pressões arteriais diastólica e média. Estes resultados garantem que os efeitos dos tratamentos anti-hipertensivos sobre a densidade capilar, observados após o tratamento farmacológico, não sofreram a influência de efeitos anti-hipertensivos diferentes entre os grupos.

Apesar da queda semelhante da PA nos diferentes grupos de SHR tratados farmacologicamente, estes animais não atingiram níveis de PA semelhantes aos dos ratos normotensos controle (Wistar). Isto ocorreu, provavelmente, em virtude dos altos níveis iniciais de PA apresentados pelos SHR, sendo difícil a normalização da PA dos mesmos através das monoterapias utilizadas.

Os diferentes grupos de animais tratados exibiram perfis de queda da PA diferentes ao longo das 4 semanas de tratamento. Assim, os tratamentos de SHR com losartan e nifedipina promoveram uma redução da PAS mais rapidamente que os tratamentos com atenolol e enalapril. Estes efeitos são compatíveis com os mecanismos de ação destes fármacos e com os achados terapêuticos da literatura (9).

O atenolol, um antagonista do receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, promove, inicialmente, uma redução no débito cardíaco acompanhada de um aumento reflexo na resistência periférica, sem nenhuma modificação na PA. Lentamente, a resistência periférica retorna aos valores basais, porém o débito cardíaco se mantém reduzido, levando a uma redução na PA (188). Além destes, a queda na liberação de renina pelas células justaglomerulares, induzida pelo atenolol, leva à redução dos níveis plasmáticos de Ang II, o que é fundamental para o efeito anti-hipertensivo deste fármaco. Este efeito lento sobre a redução da PAS foi confirmado em nosso estudo, onde o atenolol levou em torno de 2 semanas para reduzir a PAS de SHR.

A nifedipina, um bloqueador dos canais de cálcio, é capaz de reduzir a PA através do relaxamento do músculo liso vascular e da conseqüente diminuição da resistência vascular periférica (131). Este efeito vasodilatador direto é rápido, o que explica o perfil de queda da PA observada com o uso deste fármaco em nosso estudo.

O enalapril, um iECA, promove seu efeito anti-hipertensivo através da inibição da formação de Ang II, reduzindo os efeitos fisiológicos desta molécula que incluem: vasoconstrição, estimulação do sistema nervoso simpático, aumento da liberação de aldosterona e aumento na retenção de  $\text{Na}^+$ . No entanto, a queda na PA observada com o uso deste agente pode ser bastante lenta, podendo levar cerca de 1 mês para chegar a um valor máximo em humanos (108). Este efeito lento sobre a redução da PAS foi confirmado em nosso estudo, onde o enalapril levou em torno de 2 semanas para reduzir a PAS de SHR.

O losartan, um antagonista do receptor  $\text{AT}_1$  de Ang II, promove seu efeito anti-hipertensivo através da prevenção da atividade da Ang II, causando: relaxamento do músculo liso vascular com vasodilatação, aumento na excreção de sal e água pelos rins, redução do volume plasmático e redução da hipertrofia celular (108). Ao provocar vasodilatação direta, este agente leva a uma rápida redução da PAS, que foi observada com o uso deste fármaco em nosso estudo.

### **5.3 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Funcional do Músculo Esquelético e da Pele**

O uso da microscopia intravital, através da técnica de epi-iluminação acoplada à fluorescência, permite a visualização da rede de capilares espontaneamente perfundidos de um determinado tecido, ao longo de um determinado tempo. Assim, através da contagem dos capilares perfundidos observados na pele da orelha e na fáscia ventral do músculo esquelético grácil, foi possível a mensuração e comparação do número de capilares perfundidos entre os diferentes grupos de animais. Esta medida foi tomada como sendo a densidade capilar

funcional destes tecidos e representa o conjunto dos capilares teciduais perfundidos, ou seja, funcionais de um determinado leito vascular.

A escolha da pele da orelha se deu por dois motivos principais: (1) a técnica de visualização deste leito vascular por microscopia intravital encontrava-se perfeitamente desenvolvida em nosso laboratório; (2) a pele é o leito vascular utilizado em pesquisa clínica na determinação da densidade capilar funcional, em virtude do acesso não-invasivo a este local através de técnicas de microscopia intravital. Além disso, já foi demonstrado em humanos que as alterações microvasculares cutâneas, tais como a vasodilatação dependente de endotélio e o recrutamento capilar prejudicados, estão relacionadas com o aumento do risco cardiovascular, avaliado através do aumento da doença cardíaca coronariana (189).

Já o tecido muscular esquelético, foi investigado, em virtude de sua importante participação na determinação da resistência vascular periférica. O uso do músculo grácil ocorreu pelo extenso uso do mesmo com finalidade semelhante em diversos trabalhos descritos na literatura (3, 38, 190) e em função da facilidade de acesso ao mesmo para a visualização sob o microscópio.

Em primeiro lugar, verificou-se que os animais SHR controle apresentavam um número significativamente reduzido de capilares em relação aos ratos normotensos Wistar. Isto indica que a hipertensão neste modelo animal (SHR) é acompanhada de rarefação capilar funcional, pelo menos na pele e no músculo esquelético. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que atribuem modificações funcionais na microcirculação destes animais (24, 34).

O tratamento dos ratos SHR com diferentes fármacos anti-hipertensivos promoveu modificações diferenciadas na densidade capilar funcional destes animais na pele e no músculo grácil.

O losartan, antagonista do receptor  $AT_1$  de Ang II, foi capaz de reverter a rarefação capilar observada nos SHR em ambos os leitos vasculares, gerando valores de densidade capilar muscular esquelética e da pele semelhantes aos dos animais normotensos Wistar. É sabido que a Ang II tem alta capacidade de promover a vasoconstrição das arteríolas atuando através do receptor  $AT_1$  (108). Em SHR, esta vasoconstrição crônica pode ser a principal responsável pela rarefação capilar funcional. Assim, o bloqueio farmacológico dos receptores  $AT_1$  realizado neste estudo, levou a um efeito vasodilatador nos principais leitos vasculares, refletindo na reversão da rarefação capilar funcional na pele e no músculo esquelético.

O bloqueador dos canais de cálcio, nifedipina, apresentou efeitos semelhantes aos do losartan. Estes resultados também podem ser atribuídos a alta capacidade vasodilatadora deste agente anti-hipertensivo. O bloqueio da entrada de cálcio na célula do músculo liso vascular

arteriolar impede o acoplamento e a formação do complexo entre cálcio e a calmodulina. Este complexo é responsável pela ativação da proteína quinase da cadeia leve de miosina que, por sua vez, tem a função de fosforilar a miosina, permitindo, assim, o acoplamento desta com a actina e a contração muscular (131). Assim, a nifedipina é um fármaco com atividade vasodilatadora direta. Este efeito farmacológico foi demonstrado através da melhora da rarefação capilar funcional de SHR.

O inibidor da enzima conversora de angiotensina, enalapril, apresentou efeitos diferenciados sobre a densidade capilar funcional nos leitos vasculares estudados. Assim, este agente promoveu pouco efeito sobre a densidade capilar funcional esquelética, porém foi capaz de aumentar a densidade capilar funcional cutânea, no entanto sem ser capaz de atingir níveis de densidade capilar neste local semelhantes aos dos ratos normotensos Wistar. A ação farmacológica anti-hipertensiva deste agente terapêutico se dá através da inibição da enzima responsável pela catálise da reação que transforma Ang I em Ang II. Conforme descrito anteriormente, a Ang II possui alta capacidade de elevar a PA através de diferentes mecanismos e a inibição da sua formação leva à queda da PA em hipertensos (111). Assim, seria esperado que a inibição da formação da Ang II e, conseqüentemente, da sua ação vasoconstritora pelo enalapril, levasse a uma melhora da densidade capilar funcional dos animais SHR. No entanto, a capacidade vasodilatadora dos iECA não está distribuída homogêneamente por todos os leitos vasculares, refletindo, possivelmente, as diferentes afinidades dos iECA pelas diversas isoformas desta enzima expressas nos diversos tecidos (191, 192). Assim, a resistência vascular no rim, fígado e pele é mais afetada por estes agentes do que este mesmo parâmetro no músculo esquelético (191). Estes dados podem explicar a ausência de efeito deste agente sobre a densidade capilar funcional no músculo esquelético de SHR.

O antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgico, atenolol, não apresentou qualquer efeito sobre a densidade capilar funcional tanto na pele quanto no músculo esquelético. É bem conhecido que a ação farmacológica anti-hipertensiva deste agente se dá principalmente através da redução do débito cardíaco, bem como através da redução da liberação de renina pelas células justaglomerulares renais. Assim, este fármaco não possui efeito vasodilatador, promovendo, por outro lado, efeito vasoconstritor em função do bloqueio dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, sobretudo no início do tratamento, apesar de se tratar de um bloqueador  $\beta_1$ -seletivo (108). Dessa forma, a incapacidade deste fármaco em modificar a rarefação capilar observada em SHR pode ser atribuída ao seu mecanismo de ação farmacológica.

#### **5.4 - Correlação entre a Densidade Capilar Funcional no Músculo e na Pele**

Conforme descrito anteriormente, foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele, quando comparados todos os valores referentes a todos os grupos de animais estudados.

Este resultado possui um significado clínico importante, já que as medidas de densidade capilar em pesquisa clínica são realizadas de forma não-invasiva, utilizando a pele dos dedos das mãos ou pés (nos pacientes diabéticos) (51). Até o momento, não era possível determinar até que ponto estes dados de densidade capilar obtidos na pele poderiam ser extrapolados para outros leitos vasculares. Assim, o presente estudo mostrou que, pelo menos neste modelo animal, os dados de densidade capilar funcional observados na pele podem ser extrapolados para o músculo esquelético.

Conforme descrito anteriormente, o músculo esquelético possui participação importante na determinação da resistência vascular periférica. Além disso, também foi mostrado que a resistência vascular periférica aumentada é o principal fator que mantém a PA elevada em pacientes hipertensos e que este aumento pode ocorrer em função da rarefação capilar observada nestes pacientes (19, 22). Assim, é fundamental o conhecimento dos efeitos do tratamento farmacológico sobre a densidade capilar funcional na pele, pois estes dados podem ser usados para se conhecer a eficácia clínica do tratamento farmacológico no que se refere aos efeitos sobre a microcirculação. Dessa forma, os estudos realizados na microcirculação da pele de pacientes hipertensos, como o estudo observacional realizado por Debbabi e cols. (51) descrito anteriormente, podem ser utilizados para a predição dos efeitos de tratamentos farmacológicos sobre a microcirculação do músculo esquelético.

#### **5.5 - Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Esquelético e do Ventrículo Esquerdo**

Na HAS, ocorre o espessamento da parede dos vasos da microcirculação, com redução da luz destes vasos, de tal forma que, eventualmente, estes vasos se encontram funcionalmente fechados. O resultado é a redução no número de arteríolas ou capilares em um dado leito vascular. Tais mudanças já foram vistas na estrutura e na densidade da microcirculação de músculo cardíaco, na conjuntiva e na retina, e nos rins. Na HAS, ocorre um ciclo vicioso, onde o aumento na PA produz um aumento na resistência na microcirculação, levando a uma maior elevação da PA (193).

No presente trabalho, a densidade capilar estrutural pode ser entendida como o número total de capilares presentes em um determinado tecido, ou seja, incluindo os capilares

funcionais (perfundidos), bem como os capilares não-funcionais (presentes no tecido, porém não perfundidos).

A determinação da densidade capilar estrutural no músculo esquelético grácil e no ventrículo esquerdo dos ratos foi realizada através de cortes histológicos em parafina e pela marcação dos capilares com uma lectina que se liga com alta afinidade ao endotélio capilar.

No músculo esquelético, em virtude da orientação dos capilares paralelos às fibras musculares, foi possível a realização de cortes histológicos em sentido transversal para a contagem dos capilares e das fibras musculares neste tecido. Assim, a relação entre o número de capilares por fibra em um determinado campo microscópico foi tida como sendo a densidade capilar estrutural deste leito vascular. Este parâmetro foi utilizado no lugar do número de capilares totais em um campo microscópico, já que este último está sujeito a variações relacionadas ao tamanho das fibras musculares observadas no campo, ou seja, fibras musculares grandes podem levar a uma diminuição no número total de capilares que, não necessariamente, corresponde ao que realmente está ocorrendo no tecido.

O uso deste leito vascular se deu pela sua importância na determinação da resistência vascular periférica, bem como pela possibilidade de comparação da densidade capilar funcional e estrutural. Esta comparação permite avaliar se o efeito farmacológico vasodilatador responsável pelo aumento da densidade capilar funcional neste tecido, descrito anteriormente, foi acompanhado de angiogênese capilar.

No coração (ventrículo esquerdo), em virtude da orientação anisotrópica deste tecido, os cortes transversais realizados no mesmo não foram capazes de reproduzir uma orientação definida de capilares e fibras musculares. Assim, estes cortes produziam padrões de imagens com capilares orientados transversalmente e longitudinalmente ao eixo de corte, não permitindo uma comparação em relação a uma análise morfológica quantitativa de capilares e fibras musculares. Assim, optamos por utilizar o método *orientator* que permite a obtenção de seções aleatórias uniformemente isotrópicas, ou seja, seções que apresentam as mesmas características em todas as direções, já descrito anteriormente (177). Assim, a relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras musculares neste tecido foi tomada como sendo o parâmetro de densidade capilar estrutural no ventrículo esquerdo. Novamente, este parâmetro foi preferido em relação à densidade de volume de capilares isoladamente, já que é bem conhecida a existência de hipertrofia das fibras cardíacas no ventrículo esquerdo em hipertensos, o que poderia resultar em variações na densidade capilar estrutural não relacionadas ao tratamento farmacológico.

O estudo da densidade capilar estrutural neste tecido é importante, já que se trata de um leito vascular comumente envolvido em lesões de órgão-alvo em pacientes hipertensos

crônicos não tratados. Assim, a HAS pode agravar o quadro da doença cardíaca isquêmica e, eventualmente, a insuficiência cardíaca congestiva que são acompanhadas da hipertrofia do ventrículo esquerdo (89-91). Nestes casos, as alterações da microcirculação coronariana na hipertrofia do ventrículo esquerdo parecem ter um papel importante nas lesões de órgão-alvo (92, 93). Assim, a avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos farmacológicos sobre a densidade capilar estrutural neste tecido permite diferenciar os fármacos estudados quanto à capacidade de reduzir/prevenir a ocorrência de lesões de órgão-alvo no coração.

Em primeiro lugar, verificou-se que os animais SHR controle apresentavam uma relação capilar/fibra significativamente reduzida quando comparados com os ratos normotensos Wistar, tanto no músculo esquelético, quanto no ventrículo esquerdo. Isto indica que a hipertensão neste modelo animal (SHR) é acompanhada de rarefação capilar estrutural, pelo menos nestes leitos vasculares. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que atribuem modificações estruturais na microcirculação destes animais tanto no músculo esquelético (36, 41) quanto no ventrículo esquerdo (95, 96). Conforme discutido anteriormente, pode-se admitir que esta rarefação capilar estrutural seja uma consequência do estado hipertensivo crônico, porém também é possível que seja uma das causas desta doença. De qualquer forma, a reversão deste estado microcirculatório alterado é fundamental para a eficácia do tratamento farmacológico, bem como para a prevenção de lesões de órgão-alvo.

Novas técnicas que exploram a microcirculação coronariana têm mostrado que os danos microvasculares resultam na redução vasodilatadora coronariana, um importante preditor de deterioração clínica e morte (193). A rede capilar é um determinante crucial para o suprimento de oxigênio no coração. De fato, a densidade capilar e a distância inter-capilar são parâmetros importantes para se acessar a isquemia. Na doença cardíaca hipertensiva, a densidade capilar está diminuída (rarefação) (19) e, dependendo do tamanho do cardiomiócito, as distâncias inter-capilares estão aumentadas, o que piora a isquemia do miocárdio (97).

O tratamento dos ratos SHR com diferentes fármacos anti-hipertensivos promoveu modificações diferentes na densidade capilar estrutural destes animais no músculo grácil e no ventrículo esquerdo.

O antagonista dos receptores AT<sub>1</sub>, losartan, foi capaz de reverter a rarefação capilar observada nos SHR em ambos os leitos vasculares, gerando valores de densidade capilar estrutural muscular esquelética e do ventrículo esquerdo semelhantes aos dos animais normotensos Wistar. Estes dados mostram que, além da atividade vasodilatadora deste agente responsável pela melhora da densidade capilar funcional descrita anteriormente, este fármaco também é capaz de promover angiogênese no músculo esquelético e no ventrículo esquerdo.

Estes efeitos podem ser atribuídos aos níveis plasmáticos de renina e de Ang II aumentados em função do bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> (164), levando a uma estimulação acentuada do receptor AT<sub>2</sub> que estimula a liberação de cininas e NO – moléculas que medeiam a angiogênese (165). Estes efeitos pró-angiogênicos estão de acordo com alguns dados da literatura, sobretudo relacionados aos efeitos sobre o ventrículo esquerdo (150, 166). Estes dados sugerem que a eficácia dos bloqueadores do receptor AT<sub>1</sub> pós-infarto do miocárdio pode ser devida não apenas à atenuação do remodelamento do ventrículo esquerdo, mas também por um efeito estimulatório na angiogênese (167). Assim, pode-se considerar que os antagonistas do receptor AT<sub>1</sub> são importantes no tratamento da hipertensão arterial, não apenas pela redução da resistência vascular periférica aumentada nesta doença, mas também pela prevenção de lesões de órgão-alvo promovida através dos efeitos pró-angiogênicos na microcirculação. O estudo futuro da produção de fatores pró-angiogênicos irá esclarecer os mecanismos envolvidos nesta atividade.

O bloqueador dos canais de cálcio, nifedipina, apresentou efeitos diferenciados nos dois leitos vasculares estudados. Primeiramente, observou-se a reversão da rarefação capilar observada nos SHR no músculo esquelético, gerando valores semelhantes aos dos ratos normotensos Wistar. Este resultado está de acordo com dados de literatura que mostraram um aumento dos efeitos do NO, um agente pró-angiogênico e uma diminuição da ET-1 nas células de músculo liso vascular, melhorando a função endotelial após tratamento farmacológico com bloqueadores dos canais de cálcio em humanos (48). Em outro estudo, o uso de nifedipina foi capaz de atenuar os danos musculares causados pelo exercício excêntrico, em especial levando ao aumento da relação capilar/fibra no músculo esquelético soleus em ratos (173). Este efeito pró-angiogênico dos bloqueadores dos canais de cálcio pode ser atribuído à angiogênese induzida pelo aumento do fluxo sanguíneo (194). Neste processo, o aumento do fluxo sanguíneo induzido pela vasodilatação provocada pela nifedipina, pode resultar no aumento da velocidade do fluxo sanguíneo, conseqüentemente, aumentando o estresse de cisalhamento e, possivelmente, aumentando a tensão da parede dos capilares (194). Este aumento no estresse de cisalhamento pode induzir a proliferação de células endoteliais tanto pela modificação da região apical (glicocálice) da célula, quanto da região basal (lâmina basal e matriz extracelular). O aumento no estresse de cisalhamento também leva a um aumento na produção de metaloproteinases e VEGF (194, 195). Além disso, este evento também pode ativar diversas proteases, tais como ativadores de plasminogênio ou pode deixar a superfície luminal das células endoteliais mais suscetíveis para a ação destes fatores, já que pode danificar o glicocálice (194). O estresse de cisalhamento promove, ainda,

a liberação de prostaglandinas e NO pelas células endoteliais, substâncias que podem estimular o crescimento capilar (194).

Por outro lado, não foi observado qualquer efeito do tratamento farmacológico dos SHR com nifedipina sobre a rarefação capilar mostrada no ventrículo esquerdo destes animais. No coração, o estresse de cisalhamento resultante do fluxo sanguíneo aumentado não parece ter um papel crucial na angiogênese, já que esta pode ocorrer mesmo na ausência de fluxo aumentado. Neste órgão, a bradicardia parece estar envolvida na angiogênese. Durante a bradicardia, a duração da diástole é mais prolongada do que a duração da sístole, sendo que os diâmetros dos capilares e o fluxo sanguíneo coronariano são maiores durante a diástole. Assim, a tensão da parede capilar pode ser aumentada durante um longo período de diástole e isto pode resultar na quebra da membrana basal do endotélio e, possivelmente, na liberação de fatores de crescimento estocados nesta membrana basal. Ljungqvist et al. (196) demonstraram uma proliferação capilar no coração após a administração crônica do vasodilatador coronariano dipiridamol, enquanto Mall et al. (197) atingiram resultado similar utilizando etanol. Ziada et al. (198) induziram crescimento capilar após a administração crônica de adenosina ou do derivado de xantina HWA 285, ambas são drogas que aumentam o fluxo coronariano, mas não com a administração de prazosina, que não afeta o fluxo coronariano (199), embora a prazosina estimule o crescimento capilar em músculo esquelético, quando o fluxo neste tecido está aumentado. (200). No entanto, diversos estudos mostraram atividade pró-angiogênica dos bloqueadores dos canais de cálcio no coração (72, 95, 159, 169, 171, 172). Assim, de forma surpreendente, no presente estudo, a nifedipina não foi capaz de reverter a rarefação capilar estrutural no ventrículo esquerdo de SHR. A investigação futura de fatores pró-angiogênicos (VEGF, NOS e PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas) poderá esclarecer os mecanismos envolvidos neste efeito.

O inibidor da enzima conversora de angiotensina, enalapril, apresentou efeitos semelhantes aos do antagonista dos receptores AT<sub>1</sub> losartan sobre a densidade capilar estrutural nos leitos vasculares estudados. Muito embora este agente tenha tido um efeito inferior ao do losartan e ao da nifedipina na relação capilar/fibra no músculo esquelético, o mesmo foi capaz de reverter a rarefação capilar estrutural observada nos SHR neste leito vascular. Além disso, no ventrículo esquerdo, o enalapril teve efeito semelhante ao do losartan, revertendo a rarefação capilar estrutural neste tecido. Estes resultados demonstram que os efeitos pró-angiogênicos promovidos por este agente no músculo esquelético ocorreram por mecanismos independentes da indução da vasodilatação neste tecido, já que este agente não promoveu qualquer alteração na densidade capilar funcional neste leito vascular.

Os efeitos pró-angiogênicos desta classe estão de acordo com diversos dados de literatura que mostraram este papel para os iECA (95, 161, 162). A inibição da quebra de bradicinina, mais do que os efeitos mediados por Ang II, podem ser responsáveis pelos efeitos pró-angiogênicos dos iECA, conforme detalhado anteriormente na Seção 1.7 (152). Assim, apesar do menor efeito em relação aos antagonistas do receptor AT<sub>1</sub>, principalmente no que se refere ao músculo esquelético, o bloqueio da enzima conversora de angiotensina foi capaz de promover a angiogênese no coração e no músculo esquelético de ratos SHR, mostrando que o tratamento farmacológico com esta classe de anti-hipertensivos pode ter efeitos benéficos sobretudo sobre as lesões de órgão-alvo em hipertensos.

O antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, atenolol, não apresentou qualquer efeito sobre a densidade capilar estrutural tanto no músculo esquelético quanto no ventrículo esquerdo. Embora os  $\beta$ -bloqueadores sejam amplamente utilizados como agentes anti-hipertensivos, existem poucas evidências que eles exerçam uma ação benéfica marcante na estrutura da microcirculação ou na rarefação microvascular. O tratamento com propranolol não modificou a área de seção cruzada da parede do vaso ou o diâmetro externo da dilatação máxima das arteríolas cerebrais em SHRSP (139). Em pacientes hipertensos, o tratamento com atenolol por um ano não produziu nenhum aumento significativo na razão parede-luz de pequenas artérias subcutâneas (140). No entanto, não é do conhecimento do autor a existência de estudos referentes às atividades desta classe farmacológica sobre a densidade capilar. Assim, este estudo mostrou que, apesar da eficácia clínica comprovada deste agente, o mesmo não possui qualquer efeito sobre a rarefação capilar funcional ou estrutural nos tecidos estudados.



## 6 – CONCLUSÕES

Em nosso estudo, as alterações microvasculares foram observadas através da determinação da rarefação capilar funcional e estrutural em SHR, quando comparados com ratos normotensos Wistar. Assim, ficou comprovado que a hipertensão nestes animais é acompanhada da redução do número de capilares perfundidos, bem como do número de capilares totais presentes nos tecidos estudados. Estes resultados mostram que a rarefação capilar em SHR ocorre não apenas na pele e no músculo esquelético, mas também no miocárdio, que é um órgão comumente envolvido em lesões de órgão-alvo nesta doença.

Na hipertensão arterial, as alterações microvasculares possuem um papel crítico no desenvolvimento das lesões de órgão-alvo, incluindo o agravamento do quadro de isquemia do miocárdio e de doenças renais. O presente estudo mostrou que os diferentes agentes anti-hipertensivos possuem capacidades distintas sobre a redução ou a reversão das alterações microvasculares observadas na hipertensão arterial. Já que todos os fármacos levaram a uma queda semelhante da PA de SHR, pode-se considerar que os efeitos microcirculatórios das diferentes drogas anti-hipertensivas são independentes dos seus efeitos sobre a redução da PA. Estas diferenças podem ser utilizadas para guiar o tratamento anti-hipertensivo, no sentido de se obter cardioproteção e na redução das lesões de órgão-alvo em geral. Em nosso estudo, o bloqueio dos receptores  $AT_1$  apresenta vantagens adicionais sobre a inibição da enzima conversora de angiotensina, já que o losartan, mas não o enalapril, aumentou a densidade capilar funcional e, conseqüentemente, a perfusão tecidual no músculo esquelético dos ratos hipertensos. Por outro lado, o tratamento crônico, tanto com enalapril quanto com losartan, mostrou a capacidade de indução da angiogênese no músculo esquelético e no coração de SHR. Entretanto, no presente estudo não foram avaliadas as vias moleculares envolvidas no processo de angiogênese, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular, a óxido nítrico sintase endotelial e o fator induzido por hipóxia do tipo 1. Assim, estudos futuros são necessários para se verificar os efeitos das diferentes drogas anti-hipertensivas na regulação fisiológica da angiogênese.

Finalmente, verificou-se uma correlação dos dados obtidos na microscopia intravital na pele da orelha e no músculo esquelético. Estes resultados apontam para modificações semelhantes na microcirculação nestes dois leitos vasculares durante o tratamento farmacológico da hipertensão arterial, indicando que as medidas obtidas na clínica na pele de pacientes pode refletir o que está ocorrendo de forma sistêmica no organismo.

**7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. SUS. Banco de dados sobre a saúde no Brasil. DATASUS. 2002.
2. Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*. 2003 Nov;21(11):1983-92.
3. Melo RM, Martinho E, Jr., Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003 Oct;42(4):851-7.
4. de Souza AR, Costa A, Nakamura D, Mocheti LN, Stevanato Filho PR, Ovando LA. A study on systemic arterial hypertension in Campo Grande, MS, Brazil. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Apr;88(4):441-6.
5. Muxfeldt ES, Nogueira Ada R, Salles GF, Bloch KV. Demographic and clinical characteristics of hypertensive patients in the internal medicine outpatient clinic of a university hospital in Rio de Janeiro. *Sao Paulo Med J*. 2004 May 6;122(3):87-93.
6. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*. 2003 May 21;289(19):2560-72.
7. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002 Dec 14;360(9349):1903-13.
8. Lessa I, Fonseca J. [Race, compliance to treatment and/or consultation and control of arterial hypertension]. *Arq Bras Cardiol*. 1997 Jun;68(6):443-9.
9. Cardiologia SB, Hipertensão SB, Nefrologia SB. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Pan American Journal of Public Health*. 2006.
10. Borst JG, Borst-De Geus A. Hypertension explained by Starling's theory of circulatory homeostasis. *Lancet*. 1963 Mar 30;1:677-82.
11. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AV, Jr., Scheel KW, Manning RD, Jr., Norman RA, Jr. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med*. 1972 May;52(5):584-94.
12. Grisk O, Rettig R. Interactions between the sympathetic nervous system and the kidneys in arterial hypertension. *Cardiovasc Res*. 2004 Feb 1;61(2):238-46.

13. Grassi G. Counteracting the sympathetic nervous system in essential hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004 Sep;13(5):513-9.
14. Cabassi A, Vinci S, Cantoni AM, Quartieri F, Moschini L, Cavazzini S, et al. Sympathetic activation in adipose tissue and skeletal muscle of hypertensive rats. *Hypertension*. 2002 Feb;39(2 Pt 2):656-61.
15. Robertson AL, Khairallah PA. Effects of angiotensin II and some analogues on vascular permeability in the rabbit. *Circ Res*. 1972 Dec;31(6):923-31.
16. Rumantir MS, Kaye DM, Jennings GL, Vaz M, Hastings JA, Esler MD. Phenotypic evidence of faulty neuronal norepinephrine reuptake in essential hypertension. *Hypertension*. 2000 Nov;36(5):824-9.
17. Shannon J, Jordan J, Costa F, Robertson RM, Biaggioni I. The hypertension of autonomic failure and its treatment. *Hypertension*. 1997 Nov;30(5):1062-7.
18. Weitz G, Deckert P, Heindl S, Struck J, Perras B, Dodt C. Evidence for lower sympathetic nerve activity in young adults with low birth weight. *J Hypertens*. 2003 May;21(5):943-50.
19. Struijker Boudier HA, le Noble JL, Messing MW, Huijberts MS, le Noble FA, van Essen H. The microcirculation and hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1992 Dec;10(7):S147-56.
20. Mulvany MJ. Resistance vessel structure and the pathogenesis of hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1993 Dec;11(5):S7-12.
21. le Noble FA, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker Boudier HA. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens*. 1998 Nov;16(11):1563-72.
22. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation*. 2001 Aug 7;104(6):735-40.
23. Guyton AC, Hall JE. *Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Health Medicine ed; 2005.
24. Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Levy BI. Hypertension: a disease of the microcirculation? *Hypertension*. 2006 Dec;48(6):1012-7.
25. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999 Apr;79(2):387-423.
26. Davis MJ. Myogenic response gradient in an arteriolar network. *Am J Physiol*. 1993 Jun;264(6 Pt 2):H2168-79.
27. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, et al. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Apr;280(4):H1427-33.

28. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology : Text & Atlas (Basic Histology)*. McGraw-Hill/Appleton & Lange ed; 2005.
29. James MA, Tullett J, Hemsley AG, Shore AC. Effects of aging and hypertension on the microcirculation. *Hypertension*. 2006 May;47(5):968-74.
30. Conway J. Hemodynamic aspects of essential hypertension in humans. *Physiol Rev*. 1984 Apr;64(2):617-60.
31. Vicaut E, Hou X. Local renin-angiotensin system in the microcirculation of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1994 Jul;24(1):70-6.
32. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*. 2004 Sep;17(9):852-60.
33. Williams SA, Boolell M, MacGregor GA, Smaje LH, Wasserman SM, Tooke JE. Capillary hypertension and abnormal pressure dynamics in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1990 Jul;79(1):5-8.
34. Vicaut E. Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs*. 1999;59 Spec No:1-10.
35. Battegay EJ, de Miguel LS, Petrimpol M, Humar R. Effects of anti-hypertensive drugs on vessel rarefaction. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Apr;7(2):151-7.
36. Boegehold MA, Johnson MD, Overbeck HW. Pressure-independent arteriolar rarefaction in hypertension. *Am J Physiol*. 1991 Jul;261(1 Pt 2):H83-7.
37. Kubis N, Besnard S, Silvestre JS, Feletou M, Huang PL, Levy BI, et al. Decreased arteriolar density in endothelial nitric oxide synthase knockout mice is due to hypertension, not to the constitutive defect in endothelial nitric oxide synthase enzyme. *J Hypertens*. 2002 Feb;20(2):273-80.
38. Prewitt RL, Chen, II, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1982 Aug;243(2):H243-51.
39. Chen, II, Prewitt RL, Dowell RF. Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat cremaster muscle. *Am J Physiol*. 1981 Sep;241(3):H306-10.
40. le Noble JL, Tangelder GJ, Slaaf DW, van Essen H, Reneman RS, Struyker-Boudier HA. A functional morphometric study of the cremaster muscle microcirculation in young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1990 Aug;8(8):741-8.
41. Scheidegger KJ, Wood JM, van Essen H, Struijker-Boudier HA. Effects of prolonged blockade of the renin angiotensin system on striated muscle microcirculation of spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996 Sep;278(3):1276-81.
42. Henrich H, Hertel R, Assmann R. Structural differences in the mesentery microcirculation between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch*. 1978 Jul 18;375(2):153-9.

43. Haack DW, Schaffer JJ, Simpson JG. Comparisons of cutaneous microvessels from spontaneously hypertensive, normotensive Wistar-Kyoto, and normal Wistar rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1980 Sep;164(4):453-8.
44. Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens*. 1994 Feb;7(2):193-200.
45. Sullivan JM, Prewitt RL, Josephs JA. Attenuation of the microcirculation in young patients with high-output borderline hypertension. *Hypertension*. 1983 Nov-Dec;5(6):844-51.
46. Serne EH, Gans RO, ter Maaten JC, Tangelder GJ, Donker AJ, Stehouwer CD. Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction. *Hypertension*. 2001 Aug;38(2):238-42.
47. Henrich HA, Romen W, Heimgartner W, Hartung E, Baumer F. Capillary rarefaction characteristic of the skeletal muscle of hypertensive patients. *Klin Wochenschr*. 1988 Jan 15;66(2):54-60.
48. Hernandez N, Torres SH, Finol HJ, Vera O. Capillary changes in skeletal muscle of patients with essential hypertension. *Anat Rec*. 1999 Dec 1;256(4):425-32.
49. Antonios TF, Rattray FE, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Maximization of skin capillaries during intravital video-microscopy in essential hypertension: comparison between venous congestion, reactive hyperaemia and core heat load tests. *Clin Sci (Lond)*. 1999 Oct;97(4):523-8.
50. Noon JP, Walker BR, Webb DJ, Shore AC, Holton DW, Edwards HV, et al. Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest*. 1997 Apr 15;99(8):1873-9.
51. Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibirica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2006 May;19(5):477-83.
52. Kiefer FN, Neysari S, Humar R, Li W, Munk VC, Battegay EJ. Hypertension and angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 2003;9(21):1733-44.
53. Sane DC, Anton L, Brosnihan KB. Angiogenic growth factors and hypertension. *Angiogenesis*. 2004;7(3):193-201.
54. Loomans CJ, Dao HH, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ. Is endothelial progenitor cell dysfunction involved in altered angiogenic processes in patients with hypertension? *Curr Hypertens Rep*. 2004 Feb;6(1):51-4.
55. Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Mar;20(3):659-66.

56. Kiefer FN, Misteli H, Kalak N, Tschudin K, Fingerle J, Van der Kooij M, et al. Inhibition of NO biosynthesis, but not elevated blood pressure, reduces angiogenesis in rat models of secondary hypertension. *Blood Press.* 2002;11(2):116-24.
57. Ciuffetti G, Schillaci G, Innocente S, Lombardini R, Pasqualini L, Notaristefano S, et al. Capillary rarefaction and abnormal cardiovascular reactivity in hypertension. *J Hypertens.* 2003 Dec;21(12):2297-303.
58. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Stacca T, Milia AF, Spano A, et al. Prevention of diabetes-induced microangiopathy by human tissue kallikrein gene transfer. *Circulation.* 2002 Aug 20;106(8):993-9.
59. Rizzoni D, Rodella L, Porteri E, Rezzani R, Guelfi D, Piccoli A, et al. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2000 Jul;18(7):885-91.
60. Gobe G, Browning J, Howard T, Hogg N, Winterford C, Cross R. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. *J Struct Biol.* 1997 Feb;118(1):63-72.
61. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1988;13:18-54.
62. Kerr JF, Gobe GC, Winterford CM, Harmon BV. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol.* 1995;46:1-27.
63. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994 Apr 15;73(8):2013-26.
64. Wyllie AH. Death from inside out: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994 Aug 30;345(1313):237-41.
65. DeLano FA, Schmid-Schonbein GW, Skalak TC, Zweifach BW. Penetration of the systemic blood pressure into the microvasculature of rat skeletal muscle. *Microvasc Res.* 1991 Jan;41(1):92-110.
66. Gobe GC, Axelsen RA, Searle JW. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest.* 1990 Dec;63(6):770-9.
67. Gobe GC, Buttyan R, Wyburn KR, Etheridge MR, Smith PJ. Clusterin expression and apoptosis in tissue remodeling associated with renal regeneration. *Kidney Int.* 1995 Feb;47(2):411-20.
68. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today.* 1994 Jan;15(1):7-10.

69. Araki S, Shimada Y, Kaji K, Hayashi H. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 May 16;168(3):1194-200.
70. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol.* 1991 Feb;138(2):447-53.
71. Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res.* 1994 Oct;214(2):584-94.
72. Kobayashi N, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Oct;25(10):2114-21.
73. Carroll RT, Galatsis P, Borosky S, Kopec KK, Kumar V, Althaus JS, et al. 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem Res Toxicol.* 2000 Apr;13(4):294-300.
74. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Filipe HM, Centorrino T, Lepore V, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on the multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Crit Care Med.* 2001 Jan;29(1):102-11.
75. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension.* 1992 Feb;19(2 Suppl):III-9.
76. Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, et al. Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):4131-6.
77. Schrammel A, Gorren AC, Schmidt K, Pfeiffer S, Mayer B. S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and (\*)NO/O(2)(\*-). *Free Radic Biol Med.* 2003 Apr 15;34(8):1078-88.
78. Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Apr 12;1655(1-3):400-8.
79. Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S. Shear stress inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Dec;17(12):3588-92.
80. Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett.* 1996 Dec 9;399(1-2):71-4.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

81. Rossig L, Haendeler J, Hermann C, Malchow P, Urbich C, Zeiher AM, et al. Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25502-7.
82. Greene AS, Tonellato PJ, Zhang Z, Lombard JH, Cowley AW, Jr. Effect of microvascular rarefaction on tissue oxygen delivery in hypertension. *Am J Physiol.* 1992 May;262(5 Pt 2):H1486-93.
83. Lombard JH, Frisbee JC, Greene AS, Hudetz AG, Roman RJ, Tonellato PJ. Microvascular flow and tissue PO<sub>2</sub> in skeletal muscle of chronic reduced renal mass hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Nov;279(5):H2295-302.
84. Engelson ET, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW. The microvasculature in skeletal muscle. II. Arteriolar network anatomy in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res.* 1986 May;31(3):356-74.
85. Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke.* 1988 Sep;19(9):1083-92.
86. Gan R, Sacco RL, Kargman DE, Roberts JK, Boden-Albala B, Gu Q. Testing the validity of the lacunar hypothesis: the Northern Manhattan Stroke Study experience. *Neurology.* 1997 May;48(5):1204-11.
87. Strandgaard S. Hypertension and stroke. *J Hypertens Suppl.* 1996 Oct;14(3):S23-7.
88. Pinto A, Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Fernandez P, Licata G. Cerebrovascular risk factors and clinical classification of strokes. *Semin Vasc Med.* 2004 Aug;4(3):287-303.
89. Casale PN, Devereux RB, Milner M, Zullo G, Harshfield GA, Pickering TG, et al. Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. *Ann Intern Med.* 1986 Aug;105(2):173-8.
90. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990 May 31;322(22):1561-6.
91. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med.* 1991 Mar 1;114(5):345-52.
92. Marcus ML, Harrison DG, Chilian WM, Koyanagi S, Inou T, Tomanek RJ, et al. Alterations in the coronary circulation in hypertrophied ventricles. *Circulation.* 1987 Jan;75(1 Pt 2):I19-25.
93. Vogt M, Motz W, Schwartzkopff B, Strauer BE. Coronary microangiopathy and cardiac hypertrophy. *Eur Heart J.* 1990 Apr;11 Suppl B:133-8.

94. Hoffman JI. Maximal coronary flow and the concept of coronary vascular reserve. *Circulation*. 1984 Aug;70(2):153-9.
95. Rakusan K, Hrdina PW, Turek Z, Lakatta EG, Spurgeon HA, Wolford GD. Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: quantitative study. *Basic Res Cardiol*. 1984 Jul-Aug;79(4):389-95.
96. Engelmann GL, Vitullo JC, Gerrity RG. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1987 Apr;60(4):487-94.
97. Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2006 Jul;111(1):81-98.
98. Davis BR, Cutler JA, Gordon DJ, Furberg CD, Wright JT, Jr., Cushman WC, et al. Rationale and design for the Antihypertensive and Lipid Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). ALLHAT Research Group. *Am J Hypertens*. 1996 Apr;9(4 Pt 1):342-60.
99. Safar ME. Systolic blood pressure, pulse pressure and arterial stiffness as cardiovascular risk factors. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 Mar;10(2):257-61.
100. Skyschally A, Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization. *Circ J*. 2003 Apr;67(4):279-86.
101. Kaul S, Ito H. Microvasculature in acute myocardial ischemia: part II: evolving concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):310-5.
102. Heusch G, Schulz R, Haude M, Erbel R. Coronary microembolization. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Jul;37(1):23-31.
103. Mulvany MJ, Hansen OK, Aalkjaer C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. *Circ Res*. 1978 Dec;43(6):854-64.
104. Weber KT, Brilla CG, Janicki JS, Reddy HK, Campbell SE. Myocardial fibrosis: role of ventricular systolic pressure, arterial hypertension, and circulating hormones. *Basic Res Cardiol*. 1991;86 Suppl 3:25-31.
105. Brilla CG, Weber KT. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res*. 1992 Jul;26(7):671-7.
106. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2001 Sep 20;345(12):861-9.

107. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz*. 2000 May;25(3):299-306.
108. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *Goodman & Gilman: as Bases Farmacológicas da Terapêutica* 2007.
109. Ferreira SH. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. *Semin Perinatol*. 2000 Feb;24(1):7-10.
110. Rocha E Silva M, Beraldo W, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*. 1949;156:262-73.
111. Neal B, MacMahon S, Chapman N. Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet*. 2000 Dec 9;356(9246):1955-64.
112. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*. 1999 Feb 20;353(9153):611-6.
113. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet*. 2000 May 6;355(9215):1575-81.
114. Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *Jama*. 1995 May 10;273(18):1450-6.
115. Dagenais GR, Yusuf S, Bourassa MG, Yi Q, Bosch J, Lonn EM, et al. Effects of ramipril on coronary events in high-risk persons: results of the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study. *Circulation*. 2001 Jul 31;104(5):522-6.
116. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med*. 1993 Nov 11;329(20):1456-62.
117. Gansevoort RT, Sluiter WJ, Hemmelder MH, de Zeeuw D, de Jong PE. Antiproteinuric effect of blood-pressure-lowering agents: a meta-analysis of comparative trials. *Nephrol Dial Transplant*. 1995 Nov;10(11):1963-74.
118. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, et al. Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal

- insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med.* 1996 Apr 11;334(15):939-45.
119. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999 Feb;33(2):613-21.
120. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R, Martinez FA, Dickstein K, Camm AJ, et al. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet.* 2000 May 6;355(9215):1582-7.
121. Cohn JN, Tognoni G. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2001 Dec 6;345(23):1667-75.
122. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001 Sep 20;345(12):851-60.
123. Lindholm LH, Carlberg B, Samuelsson O. Should beta blockers remain first choice in the treatment of primary hypertension? A meta-analysis. *Lancet.* 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1545-53.
124. Strippoli GF, Craig M, Deeks JJ, Schena FP, Craig JC. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists on mortality and renal outcomes in diabetic nephropathy: systematic review. *Bmj.* 2004 Oct 9;329(7470):828.
125. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):995-1003.
126. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):1004-10.
127. Strauss MH, Lonn EM, Verma S. Is the jury out? Class specific differences on coronary outcomes with ACE-inhibitors and ARBs: insight from meta-analysis and The Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Eur Heart J.* 2005 Nov;26(22):2351-3.
128. Dahlof B, Sever PS, Poulter NR, Wedel H, Beevers DG, Caulfield M, et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-

- Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2005 Sep 10-16;366(9489):895-906.
129. Cheung BM, Cheung GT, Lauder IJ, Lau CP, Kumana CR. Meta-analysis of large outcome trials of angiotensin receptor blockers in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2006 Jan;20(1):37-43.
130. Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH, Jr. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 6;46(5):821-6.
131. Lehmann HU, Hochrein H, Witt E, Mies HW. Hemodynamic effects of calcium antagonists. Review. *Hypertension*. 1983 Jul-Aug;5(4 Pt 2):II66-73.
132. Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Kjeldsen SE, Beevers G, de Faire U, et al. Characteristics of 9194 patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension. *Hypertension*. 1998 Dec;32(6):989-97.
133. Hansson L, Hedner T, Lund-Johansen P, Kjeldsen SE, Lindholm LH, Syvertsen JO, et al. Randomised trial of effects of calcium antagonists compared with diuretics and beta-blockers on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Nordic Diltiazem (NORDIL) study. *Lancet*. 2000 Jul 29;356(9227):359-65.
134. Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, et al. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet*. 2004 Jun 19;363(9426):2022-31.
135. Lubsen J, Wagener G, Kirwan BA, de Brouwer S, Poole-Wilson PA. Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with symptomatic stable angina and hypertension: the ACTION trial. *J Hypertens*. 2005 Mar;23(3):641-8.
136. Kohlhardt M, Fleckenstein A. Inhibition of the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1977 Jul 18;298(3):267-72.
137. Serruys PW, Brower RW, ten Katen HJ, Bom AH, Hugenholtz PG. Regional wall motion from radiopaque markers after intravenous and intracoronary injections of nifedipine. *Circulation*. 1981 Mar;63(3):584-91.
138. Theroux P, Waters DD, Debaisieux JC, Szlachcic J, Mizgala HF, Bourassa MG. Hemodynamic effects of calcium ion antagonists after acute myocardial infarction. *Clin Invest Med*. 1980;3(1-2):81-5.
139. Chillon JM, Baumbach GL. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a beta-blocker on cerebral arterioles in rats. *Hypertension*. 1999 Mar;33(3):856-61.

140. Thybo NK, Stephens N, Cooper A, Aalkjaer C, Heagerty AM, Mulvany MJ. Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension*. 1995 Apr;25(4 Pt 1):474-81.
141. Buus NH, Bottcher M, Jorgensen CG, Christensen KL, Thygesen K, Nielsen TT, et al. Myocardial perfusion during long-term angiotensin-converting enzyme inhibition or beta-blockade in patients with essential hypertension. *Hypertension*. 2004 Oct;44(4):465-70.
142. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Ueda T, Yoshimizu A, Kurisu S, et al. A comparison of angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium antagonists, beta-blockers and diuretic agents on reactive hyperemia in patients with essential hypertension: a multicenter study. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Feb;35(2):284-91.
143. Lee RM, Berecek KH, Tsoporis J, McKenzie R, Triggle CR. Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. *Hypertension*. 1991 Feb;17(2):141-50.
144. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 May;79(10):3310-4.
145. McVeigh GE. Effects of perindopril on cardiovascular remodeling. *Am J Cardiol*. 2001 Oct 4;88(7A):28i-35i.
146. Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Montague TJ, Teo KK, Benedict CR, et al. Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation*. 1994 Oct;90(4):2056-69.
147. Zimmermann R, Kastens J, Linz W, Wiemer G, Scholkens BA, Schaper J. Effect of long-term ACE inhibition on myocardial tissue in hypertensive stroke-prone rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1999 Aug;31(8):1447-56.
148. Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Cinelli A, et al. Effects of low and high doses of fosinopril on the structure and function of resistance arteries. *Hypertension*. 1995 Jul;26(1):118-23.
149. Ledingham JM, Laverty R. Renal afferent arteriolar structure in the genetically hypertensive (GH) rat and the ability of losartan and enalapril to cause structural remodelling. *J Hypertens*. 1998 Dec;16(12 Pt 2):1945-52.
150. Sabri A, Samuel JL, Marotte F, Poitevin P, Rappaport L, Levy BI. Microvasculature in angiotensin II-dependent cardiac hypertrophy in the rat. *Hypertension*. 1998 Aug;32(2):371-5.
151. Levy BI, Duriez M, Samuel JL. Coronary microvasculature alteration in hypertensive rats. Effect of treatment with a diuretic and an ACE inhibitor. *Am J Hypertens*. 2001 Jan;14(1):7-13.

152. Antonios TF, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Structural skin capillary rarefaction in essential hypertension. *Hypertension*. 1999 Apr;33(4):998-1001.
153. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res*. 2001 Oct 12;89(8):678-83.
154. Gohlke P, Kuwer I, Schnell A, Amann K, Mall G, Unger T. Blockade of bradykinin B2 receptors prevents the increase in capillary density induced by chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):478-82.
155. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest*. 1997 Apr 15;99(8):1926-35.
156. Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS. Bradykinin B2 receptor modulates renal prostaglandin E2 and nitric oxide. *Hypertension*. 1997 Mar;29(3):757-62.
157. Toblli JE, Cao G, DeRosa G, Di Gennaro F, Forcada P. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiogenesis in myocardium of obese Zucker rats. *Am J Hypertens*. 2004 Feb;17(2):172-80.
158. Frisbee JC. Reduced nitric oxide bioavailability contributes to skeletal muscle microvessel rarefaction in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Aug;289(2):R307-R16.
159. Zhang B, Shono N, Fan P, Ando S, Xu H, Jimi S, et al. Histochemical characteristics of soleus muscle in angiotensin-converting enzyme gene knockout mice. *Hypertens Res*. 2005 Aug;28(8):681-8.
160. de Souza Bomfim A, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of ACE inhibition during fetal development on cardiac microvasculature in adult spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol*. 2005 May 25;101(2):237-42.
161. Fabre JE, Rivard A, Magner M, Silver M, Isner JM. Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation*. 1999 Jun 15;99(23):3043-9.
162. Takeshita S, Tomiyama H, Yokoyama N, Kawamura Y, Furukawa T, Ishigai Y, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves defective angiogenesis in the ischemic limb of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2001 Nov;52(2):314-20.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

163. Cameron NE, Cotter MA, Robertson S. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents development of muscle and nerve dysfunction and stimulates angiogenesis in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 1992 Jan;35(1):12-8.
164. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Aug 30;163(1):284-91.
165. Seyedi N, Xu X, Nasjletti A, Hintze TH. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension*. 1995 Jul;26(1):164-70.
166. Xie Z, Gao M, Togashi H, Saito H, Koyama T. Improvement in the capillarity of the left ventricular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats following angiotensin II receptor blockade. *Clin Exp Hypertens*. 1999 May;21(4):441-52.
167. de Boer RA, Pinto YM, Suurmeijer AJ, Pokharel S, Scholtens E, Humler M, et al. Increased expression of cardiac angiotensin II type 1 (AT(1)) receptors decreases myocardial microvessel density after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2003 Feb;57(2):434-42.
168. Kitayama H, Maeshima Y, Takazawa Y, Yamamoto Y, Wu Y, Ichinose K, et al. Regulation of angiogenic factors in angiotensin II infusion model in association with tubulointerstitial injuries. *Am J Hypertens*. 2006 Jul;19(7):718-27.
169. Kumamoto H, Okamoto H, Watanabe M, Onozuka H, Yoneya K, Nakagawa I, et al. Beneficial effect of myocardial angiogenesis on cardiac remodeling process by amlodipine and MCI-154. *Am J Physiol*. 1999 Apr;276(4 Pt 2):H1117-23.
170. Dusseau J, Hutchins PM. Calcium entry blockers stimulate vasoproliferation on the chick chorioallantoic membrane. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1993 Dec;13(3):219-31.
171. Meirelles Pereira LM, Mandarim-de-Lacerda CA. Effect of antihypertensive drugs on the myocardial microvessels in rats with nitric oxide blockade. *Pathol Res Pract*. 2000;196(5):305-11.
172. Okuda N, Hayashi T, Mori T, Inamoto S, Okabe M, Mieno S, et al. Nifedipine enhances the cardioprotective effect of an angiotensin-II receptor blocker in an experimental animal model of heart failure. *Hypertens Res*. 2005 May;28(5):431-8.
173. Heap SJ, Fulgenzi GL, Hudlicka O. Microcirculation in rat soleus muscle after eccentric exercise: the effect of nifedipine. *Eur J Appl Physiol*. 2006 Aug;97(6):687-94.
174. Manolopoulos VG, Liekens S, Koolwijk P, Voets T, Peters E, Droogmans G, et al. Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels. *Gen Pharmacol*. 2000 Feb;34(2):107-16.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

175. Tornig J, Amann K, Ritz E, Nichols C, Zeier M, Mall G. Arteriolar wall thickening, capillary rarefaction and interstitial fibrosis in the heart of rats with renal failure: the effects of ramipril, nifedipine and moxonidine. *J Am Soc Nephrol.* 1996 May;7(5):667-75.
176. Hansen-Smith FM, Watson L, Lu DY, Goldstein I. Griffonia simplicifolia I: fluorescent tracer for microcirculatory vessels in nonperfused thin muscles and sectioned muscle. *Microvasc Res.* 1988 Nov;36(3):199-215.
177. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc.* 1990 Sep;159(Pt 3):301-17.
178. Gundersen HJ, Jensen EB. Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J Microsc.* 1985 May;138(Pt 2):127-42.
179. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963 Mar;27:282-93.
180. Linz W, Schafer S, Afkham F, Gerl M, Schmidts HL, Rutten H. Vasopeptidase inhibition prevents target organ damage and improves survival in spontaneously hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006 Sep;7(3):155-61.
181. Nakano D, Ogura K, Miyakoshi M, Ishii F, Kawanishi H, Kurumazuka D, et al. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006 May;70(5):1118-26.
182. Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension.* 1998 Feb;31(2):643-8.
183. Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Apr;286(4):F606-16.
184. Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL. Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2003 Feb;57(2):456-67.
185. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006 Jul 15;71(2):247-58.
186. Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res.* 2003 Aug 1;59(2):488-500.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

187. Bevers LM, Braam B, Post JA, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, Koomans HA, et al. Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension*. 2006 Jan;47(1):87-94.
188. van den Meiracker AH, Man in 't Veld AJ, van Eck HJ, Boomsma F, Schalekamp MA. Hemodynamic and hormonal adaptations to beta-adrenoceptor blockade. A 24-hour study of acebutolol, atenolol, pindolol, and propranolol in hypertensive patients. *Circulation*. 1988 Oct;78(4):957-68.
189. RG IJ, de Jongh RT, Beijk MA, van Weissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serne EH, et al. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur J Clin Invest*. 2003 Jul;33(7):536-42.
190. Amaral SL, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000 Nov;18(11):1563-72.
191. Richer C, Doussau MP, Giudicelli JF. Systemic and regional hemodynamic profile of five angiotensin I converting enzyme inhibitors in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Cardiol*. 1987 Apr 24;59(10):12D-7D.
192. Bevilacqua M, Vago T, Rogolino A, Conci F, Santoli E, Norbiato G. Affinity of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors for N- and C-binding sites of human ACE is different in heart, lung, arteries, and veins. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996 Oct;28(4):494-9.
193. Levy BI. [The importance of microcirculation and tissue perfusion in hypertension]. *Curr Med Res Opin*. 2005;21 Suppl 5:S1-6.
194. Hudlicka O. Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation*. 1998;5(1):5-23.
195. Hang J, Kong L, Gu JW, Adair TH. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1995 Nov;269(5 Pt 2):H1827-31.
196. Ljungqvist A, Folkers K. Fragment couplings with stepwise couplings in solid-phase synthesis. Synthesis of a fragment of human leukocyte interferon. *Acta Chem Scand B*. 1984;38(5):375-9.
197. Mall G, Mattfeldt T, Rieger P, Volk B, Frolov VA. Morphometric analysis of the rabbit myocardium after chronic ethanol feeding - early capillary changes. *Basic Res Cardiol*. 1982 Jan-Feb;77(1):57-67.
198. Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res*. 1984 Dec;18(12):724-32.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

199. Ziada A, Hudlicka O, Tyler KR. The effect of long-term administration of alpha 1-blocker prazosin on capillary density in cardiac and skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 1989 Dec;415(3):355-60.
200. Hudlicka O. What makes blood vessels grow? *J Physiol.* 1991 Dec;444:1-24.

**8 – ANEXO – ARTIGO NO PRELO**

“Effects of Antihypertensive Drugs on Capillary Rarefaction in Spontaneously Hypertensive Rats: Intravital Microscopy and Histologic Analysis”, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2008. Autores: Bruno Duarte Sabino, Marcos A. Lessa, Alessandro R. Nascimento, Carlos A. B. Rodrigues, Maria das Gracxas Henriques, Luciana R. Garzoni, Bernard I. Levy, Eduardo Tibiricá