

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BRUNO DUARTE SABINO

Efeitos de fármacos anti-hipertensivos de diferentes classes farmacológicas sobre a rarefação capilar funcional e estrutural em ratos espontaneamente hipertensos

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá

RIO DE JANEIRO

2008

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S116

Sabino, Bruno Duarte

Efeitos de fármacos anti-hipertensivos de diferentes classes farmacológicas sobre a rarefação capilar funcional e estrutural em ratos espontaneamente hipertensos / Bruno Duarte Sabino. – Rio de Janeiro, 2008.

xv, 83 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 66 - 83

1. Rarefação capilar. 2. Anti-hipertensivos. 3. Ratos endogâmicos SHR. 4. Microcirculação. 5. Lesões de órgão-alvo. I. Título.

CDD 616.148

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BRUNO DUARTE SABINO

EFEITOS DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS DE DIFERENTES CLASSES FARMACOLÓGICAS SOBRE A RAREFAÇÃO CAPILAR FUNCIONAL E ESTRUTURAL EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá

Aprovada em: 16/05/2008

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa- **Presidente**

Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini

Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves

Rio de Janeiro, 16 de maio de 2008.

Aos meus pais Cléa e Silvio, pois
Quem cuida com amor, sempre colherá bons frutos,
Quem ensina com ações, nunca será esquecido e
Quem trabalha com dignidade, perseverança e honestidade, será
sempre respeitado.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Thatiana que me mostrou que, quando a vida é compartilhada com amor e respeito, todas as conquistas são dobradas, todas as vitórias são mais felizes e nenhum mal é grande o bastante para vencer duas vidas que estão unidas.

Aos meus irmãos Silvia e Flávio, referências de competência, responsabilidade e dedicação que me ajudam a manter o meu caminho nos momentos mais difíceis.

Ao Rodrigo Cavalheiro que me presenteou não apenas com o brilhante trabalho técnico sem o qual esta Tese não seria possível, mas também com o prazer de sua convivência diária e com uma amizade que irá perdurar por toda a vida.

Ao Carlos Bizarro e Daniela Pacheco, brilhantes profissionais que foram fundamentais nos momentos mais difíceis desta Tese e pessoas maravilhosas, cuja convivência foi um aprendizado diário.

À Cláudia Valéria, uma amiga incondicional e sempre disposta a escutar e ajudar nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Eduardo Tibiriçá, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de aprendizado diário.

Ao Dr. Marcos Adriano Lessa, pela disponibilidade e atenção dispensadas a este Trabalho e pela presença nos momentos mais alegres da minha história recente.

À Vanessa Estato que iniciou este Trabalho e, em nenhum momento, duvidou da minha capacidade de dar continuidade ao mesmo.

A Leonardo Burlini, Bianca Gonçalves de Moura e Alessandro Rodrigues do Nascimento, então estagiários que estiveram sempre dispostos a aprender e a me auxiliar na confecção deste Trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Neurocardiovascular (Andressa, Fabiana, Solange, Flávio, Gustavo, Fernanda, Vlander, Renata, Carolina, Íris, Glauco, Leonardo Felipe, Jeferson, Roger e todos que conviveram comigo neste período), cuja convivência me ajudou a aliviar os momentos mais tensos e a compartilhar os momentos mais felizes vividos nesta Tese.

Assunto	Página
FOLHA DE ROSTO	i
FICHA CATALOGRÁFICA	ii
FOLHA DE APROVAÇÃO	iii
FOLHA DE DEDICATÓRIA	iv
FOLHA DE AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Epidemiologia da Hipertensão Arterial Sistêmica	2
1.2 – Fisiopatologia da Hipertensão Arterial Sistêmica	3
1.3 – Microcirculação	5
1.3.1 – Capilares	6
1.4 - A Microcirculação na Hipertensão	6
1.4.1 - A Rarefação Microvascular na Hipertensão	7
1.4.2 – Dados Experimentais da Rarefação na Hipertensão	8
1.4.3 – Mecanismos da Rarefação na Hipertensão	9
1.4.4 - Apoptose e Rarefação Estrutural	9
1.5 – Implicações Terapêuticas da Rarefação Microvascular	12
1.5.1 – Lesões de Órgão-Alvo Relacionadas à HAS	13
1.6 – Tratamento Farmacológico da HAS	14
1.6.1 – Anatagonistas do Receptor β -Adrenérgico	15
1.6.2 – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina	16
1.6.3 – Antagonistas do Receptor AT1 de Angiotensina II	17
1.6.4 – Antagonistas do Canal de Ca^{2+}	18
1.7 – Efeitos do Tratamento Farmacológico da HAS na Microcirculação	20
1.7.1 - β -Bloqueadores	20

1.7.1 - β -Bloqueadores	20
1.7.2 – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina	21
1.7.3 – Antagonistas do Receptor do Tipo I de Angiotensina II (AT1)	23
1.7.4 – Bloqueadores dos Canais de Cálcio	24
1.8 – Caracterização do Problema	26
2 – OBJETIVOS	27
2.1 – Objetivo Geral	28
2.2 – Objetivos Específicos	28
3 – MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 – Modelos Animais	30
3.2 – Medidas Hemodinâmicas	30
3.3 – Microscopia Intravital por Fluorescência	30
3.4 – Análise Histológica	32
3.5 – Análise Estatística	34
3.6 – Drogas	35
4 – RESULTADOS	36
4.1 – Efeitos dos Tratamentos na Pressão Arterial	37
4.2 – Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Funcional do Músculo Esquelético e da Pele	43
4.3 – Correlação entre a Densidade Capilar Funcional no Músculo e na Pele	46
4.4 – Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Esquelético e do Ventrículo Esquerdo	47
5 – DISCUSSÃO	52
5.1 – Modelos Animais de Hipertensão	53
5.2 – Efeitos dos Tratamentos na Pressão Arterial	54
5.3 - Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Funcional do Músculo Esquelético e da Pele	55

5.4 – Correlação entre a Densidade Capilar Funcional no Músculo e na Pele	58
5.5 – Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Esquelético e do Ventrículo Esquerdo	58
6 – CONCLUSÕES	64
7 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8 – ANEXO – ARTIGO NO PRELO	83

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
Figura 1.1 -	Representação esquemática da rarefação microvascular envolvendo apoptose.	11
Figura 4.2 –	Pressão arterial sistólica antes (barras abertas) e após (barras fechadas) tratamento oral durante 28 dias	38
Figura 4.3 –	Pressão arterial sistólica durante o tratamento crônico.	40
Figura 4.4 –	Pressão arterial diastólica durante o tratamento crônico.	41
Figura 4.5 –	Pressão arterial média durante o tratamento crônico.	42
Figura 4.6 –	Imagens representativas da videomicroscopia intravital da pele e do músculo grácil (MG).	43
Figura 4.7 –	Densidade capilar funcional no músculo esquelético e pele.	45
Figura 4.8 –	Correlação entre a densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele.	46
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 <i>Griffonia simplicifolia</i> .	47
Figura 4.10 –	Relação capilar/fibra no músculo esquelético.	49
Figura 4.11 -	Relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras no ventrículo esquerdo.	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
TABELA 1.1 – Classificação da pressão arterial de acordo com a medida casual no consultório (> 18 anos)	3
TABELA 3.2 - Densidade de volume de capilares	34
TABELA 4.3 – PA Basal (antes do tratamento)	37
TABELA 4.4 – Efeitos dos Tratamentos na PA (após o tratamento)	39
TABELA 4.5 – Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Funcional	44
TABELA 4.6 – Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural Muscular Esquelética	48
TABELA 4.7 – Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Miocárdio	50

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

Ang II – angiotensina II
ANOVA - análise de variância
ATE – atenolol
AUI - aleatórios e uniformemente isotrópicos
AVC – acidente vascular cerebral
DPM – desvio padrão da média
ENA – enalapril
eNOS - óxido nítrico sintase endotelial
EPM - erro padrão da media
EPR – Erro padrão relativo
ET-1 - endotelina 1
FITC - fluoresceína-isotiocianato
GSI - Griffonia simplicifolia
HAS – hipertensão arterial sistmica
iECA – inibidores da enzima conversora de angiotensina
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
LOS – losartan
MG – músculo grácil
n – número de pontos a serem contados
NIF – nifedipina
NO – xido nítrico
OMS – Organizao Mundial de Saúde
PAD – pressão arterial diastólica
PAM – pressão arterial média
PAS – pressão arterial sistólica
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
Pp - número de pontos-teste que superpõem capilares
P_T - número total de pontos-teste
SHR - *spontaneously hypertensive rats*
SHRSP - ratos espontaneamente hipertensos propensos ao derrame
SNC – sistema nervoso central
SUS – Sistema nico de Saúde

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VEI – veículo

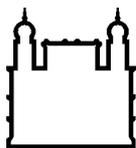
Vv – densidade de volume da estrutura em análise

Vv[cap] - densidade de volume de capilares

Vv[fib] - densidade de volume de fibras

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

WKY – Wistar Kyoto



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITOS DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS DE DIFERENTES CLASSES FARMACOLÓGICAS SOBRE A RAREFAÇÃO CAPILAR FUNCIONAL E ESTRUTURAL EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS

RESUMO

Introdução: A elevação crônica da resistência vascular sistêmica pode ser considerada como a principal alteração hemodinâmica na hipertensão arterial primária estabelecida. Investigamos os efeitos do tratamento crônico com os anti-hipertensivos atenolol (ATE), enalapril (ENA), nifedipina (NIF) e losartan (LOS) sobre a densidade capilar funcional média (DCFM) cutânea e muscular esquelética (grácil) e sobre a densidade capilar estrutural muscular esquelética e do ventrículo esquerdo de SHR. Métodos: Ratos SHR machos com 12-14 semanas receberam tratamento oral por gavagem com ATE (50 mg/kg/dia), ENA (10 mg/kg/dia), NIF (20mg/kg/dia), LOS (10mg/kg/dia) ou veículo (grupo controle) durante quatro semanas. Após o término do tratamento avaliou-se a DCFM através de microscopia intravital por epi-iluminação com fluorescência. A seguir, foi avaliada a densidade capilar estrutural através de histoquímica em parafina. Resultados: O tratamento reduziu de forma similar a pressão arterial sistólica de SHR tratados com ATE, ENA, NIF ou LOS. A DCFM encontrava-se diminuída em SHR no músculo esquelético (WKY 395 ± 17 e SHR 258 ± 13 capilares/mm², $p < 0,01$) ou pele (WKY 391 ± 18 e SHR 210 ± 15 capilares/mm², $p < 0,01$). LOS e NIF reverteram completamente este quadro em ambos os tecidos (434 ± 26 e 422 ± 18 capilares/mm² no músculo esquelético e 397 ± 31 e 391 ± 24 capilares/mm² na pele, $p < 0,01$, respectivamente), enquanto o ENA aumentou significativamente a DCFM apenas na pele de SHR (283 ± 17 , $p < 0,05$ capilares/mm²). O ATE não induziu nenhuma alteração na DCFM de SHR. Foi observada uma relação linear entre a densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele ($r = 0.654$, $p < 0.0001$). Na análise estrutural, foi observada uma relação capilar/fibra significativamente menor no músculo esquelético de SHR (WKY $1,74 \pm 0,08$ e SHR $1,40 \pm 0,06$, $p < 0,01$), que foi revertida pelos tratamentos com ENA, NIF e LOS ($1,65 \pm 0,04$; $1,78 \pm 0,1$ e $1,8 \pm 0,07$, $p < 0,01$, respectivamente). A razão entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras ($V_v[\text{cap}] / V_v[\text{fib}]$) do ventrículo esquerdo de SHR também foi significativamente reduzida (WKY $0,55 \pm 0,09$ e SHR $0,42 \pm 0,09$, $p < 0,01$). Os tratamentos com LOS ou ENA reverteram completamente a rarefação estrutural cardíaca de SHR ($0,59 \pm 0,03$ e $0,59 \pm 0,03$, $p < 0,01$, respectivamente), enquanto os tratamentos com ATE e NIF não apresentaram nenhum efeito. Discussão: Os resultados obtidos indicam que os efeitos microcirculatorios de diferentes drogas anti-hipertensivas diferem entre as classes farmacológicas e vão além da redução da pressão arterial. Este conceito pode ser útil para guiar o tratamento anti-hipertensivo na tentativa de reduzir ou até mesmo reverter as lesões de órgãos-alvo.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFEITOS DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS DE DIFERENTES CLASSES FARMACOLÓGICAS SOBRE A RAREFAÇÃO CAPILAR FUNCIONAL E ESTRUTURAL EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSIVOS

ABSTRACT

Introduction: It is well known that the major part of the increased vascular resistance in hypertension is determined at the microvascular level, resulting mainly from functional (changes in vascular reactivity) and/or structural (increased arteriolar wall thickness) abnormalities. We investigated the effects of chronic oral antihypertensive treatment on functional and structural capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats (SHR). Wistar Kyoto rats (WKY) were used as a normotensive control group. Methods: Male SHR (12-14 weeks) received oral treatment with the β -blocker atenolol (ATE) (50 mg/kg/day), angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor enalapril ENA (10 mg/kg/day), the calcium channel blocker nifedipine NIF (20mg/kg/day), the angiotensin II type I receptor (AT1) receptor antagonist losartan LOS (10mg/kg/day), or vehicle (control group) during four weeks. At the end of the treatment, the functional capillary density (FCD) was evaluated by intravital videomicroscopy with fluorescence. Then, we evaluated the structural capillary density (SCD) by immunohistochemistry embedded in paraffin. Results: In untreated rats, the FCD was lower in SHR skeletal muscle (WKY 395 ± 17 and SHR 258 ± 13 capillaries/mm², $P < 0.01$) and ear skin (WKY 391 ± 18 and SHR 210 ± 15 capillaries/mm², $P < 0.01$). A linear relationship was seen between skeletal muscle and skin capillary densities ($r = 0.654$, $P < 0.0001$). Histologic analysis showed that SHR had a lower capillary-to-fiber ratio in the skeletal muscle (WKY 1.74 ± 0.08 and SHR 1.40 ± 0.06 , $P < 0.01$). Capillary volume density-to-fiber volume density ratio in the left ventricle of SHR was also reduced (WKY 0.55 ± 0.09 and SHR 0.42 ± 0.09 , $P < 0.01$). The pharmacological treatment with ENA, LOS, ATE, or NIF, resulted in similar reductions in systolic blood pressure (19.8%, 19.1%, 17.4%, and 18.2%, respectively, $P < 0.05$). ATE did not induce any change in functional capillary density of SHR. LOS and NIFE completely reversed functional capillary rarefaction in both muscle and cutaneous tissues (434 ± 26 and 422 ± 18 capillaries/mm² in skeletal muscle and 397 ± 31 and 391 ± 24 capillaries/mm² in skin, $p < 0,01$, respectively), whereas ENA significantly increased functional capillary density only in the skin. The skeletal muscle capillary-to-fiber ratio was normalized by ENA, LOS, and NIF ($1,65 \pm 0,04$; $1,78 \pm 0,1$ and $1,8 \pm 0,07$, $p < 0,01$, respectively). Treatments with ENA or LOS normalized the cardiac structural capillary rarefaction of SHRs ($0,59 \pm 0,03$ and $0,59 \pm 0,03$, $p < 0,01$, respectively), whereas ATE and NIF had no effect. Discussion: Our results suggest that different pharmacologic classes of antihypertensive drugs with similar effect on blood pressure differ in terms of their effect on the microcirculation. This concept could be useful to guide the pharmacological treatment of hypertension, in order to reduce or even revert the target organ damage.