

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fabiana Gomes da Conceição

Efeitos anti-hipertensivos e microcirculatórios do extrato hidro-alcóolico de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) em ratos espontaneamente hipertensos.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa

RIO DE JANEIRO

2011

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

C744 Conceição, Fabiana Gomes da.

Efeitos anti-hipertensivos e microcirculatórios do extrato hidro-alcóolico de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) em ratos espontaneamente hipertensos./ Fabiana Gomes da Conceição – Rio de Janeiro: 2011.

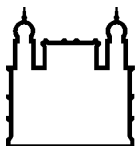
x, 59f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011.

Bibliografia: f. 53-59

1.Hipertensão arterial 2. SHR. 3. Microcirculação 4. *Echinodorus grandiflorus*. I.Título

CDD 616.132



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Fabiana Gomes da Conceição

Efeitos anti-hipertensivos e microcirculatórios do extrato hidro-alcólico de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) em ratos espontaneamente hipertensos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Adriano da Rocha Lessa

Aprovada em: 27 / 07 / 2011

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Valber da Silva Frutuoso

Prof. Dr. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni

Prof. Dr. Bruno Duarte Sabino

Rio de Janeiro, 27 de Julho de 2011

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, pois só por ele estou aqui realizando mais um sonho;

Agradecimento especial aos meus pais, pois sem eles nada aconteceria;

Agradecimento ao meu marido, Wilames, pelo apoio e suporte por esses anos;

Ao meu irmão, pelo apoio de sempre;

Ao Chefe do laboratório, Dr. Eduardo Tibiriçá e ao meu orientador Dr. Marcos Adriano, que confiaram a mim este trabalho;

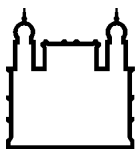
Ao Laboratório de Produtos Naturais PN3 Farmanguinhos/Fiocruz , em especial a Prof^a Dra. Maria Raquel Figueiredo, pela ajuda no preparo do extrato;

Aos meus amigos de Laboratório, Alessandro, Isabela, Nathália e Rodrigo, pela ajuda nos experimentos e a convivência durante todo esse tempo.

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de abreviaturas	ix
Lista de tabelas e figuras	x
1. Introdução	11
1.1 Plantas medicinais	11
1.1.1 <i>Echinodorus grandiflorus</i>	12
1.2 Hipertensão arterial	14
1.2.1 Disfunção endotelial	15
1.3 Microcirculação	18
1.3.1 Rarefação capilar na hipertensão arterial	19
1.4 Estratégias terapêuticas e a microcirculação	20
2. Objetivos	23
2.1 Objetivos específicos	23
3. Material e métodos	24
3.1 Material vegetal	24
3.2 Modelos animais	25
3.3 Medidas hemodinâmicas	25
3.4 Microscopia intravital por fluorescência	25
3.5 Avaliação da hipertrofia do ventrículo esquerdo	27
3.6 Análise histológica	27
3.7 Análise estatística	30
3.8 Drogas	30

4.	Resultados	31
4.1	Efeitos do tratamento com um extrato de <i>Echinodorus grandiflorus</i> na pressão arterial e na frequência cardíaca	31
4.2	Efeitos do tratamento com um extrato de EG sobre a densidade capilar funcional do músculo esquelético e na pele	35
4.3	Efeitos do tratamento na densidade capilar estrutural do músculo esquelético e do ventrículo esquerdo	38
4.4	Efeitos do tratamento sobre a hipertrofia do ventrículo esquerdo	43
5.	Discussão	45
6.	Conclusões	52
7.	Referências bibliográficas	53



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

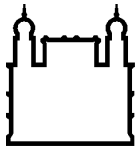
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Efeitos anti-hipertensivos e microcirculatórios do extrato hidro-alcóolico de *Echinodorus grandiflorus* (chapéu de couro) em ratos espontaneamente hipertensos.

RESUMO

Introdução: A hipertensão arterial é um grande desafio para a saúde pública, e quando não tratada, predispõe à morbidade cardiovascular e morte prematura. É sabido que grande parte do aumento da resistência vascular na hipertensão é determinada no nível microvascular e evidências recentes sugerem que uma redução na densidade capilar pode contribuir significativamente para a elevação da resistência vascular e, conseqüentemente, a pressão arterial, tanto em humanos quanto em animais de experimentação. O *Echinodorus grandiflorus* (EG), uma planta distribuídas em todo o Brasil, tem sido utilizada na medicina popular para tratar hipertensão e doenças inflamatórias. No entanto, não há estudos farmacológicos sobre os efeitos biológicos do extrato. **Objetivos:** Investigar os efeitos do extrato hidro-alcóolico de *Echinodorus grandiflorus* sobre a densidade capilar funcional e estrutural da pele, músculo esquelético e do coração em ratos espontaneamente hipertensos. **Métodos:** Para tanto, foram utilizados 10 Wistar-Kyoto (WKY) e 40 animais SHR. Os animais foram divididos em 5 grupos que receberam veículo (SHR, o grupo controle hipertensos e Wistar, o grupo controle normotenso) e EG (dose 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg) durante 28 dias por gavagem. A pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca foram mensurados semanalmente por pletismografia caudal. A densidade capilar funcional foi avaliada no músculo gracil e da pele da orelha, utilizando videomicroscopia intravital após a injeção intravenosa de fluoresceína acoplado ao dextran. A densidade capilar estrutural foi estudada na musculatura esquelética e do ventrículo esquerdo, utilizando análise histológica com FITC acoplado a lectina griffonia simplicifolia, que pode identificar as células endoteliais. **Resultados:** O tratamento oral com EG diminuiu a pressão sanguínea sistólica em diferentes doses. O tratamento com o EG nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg reverteu completamente a rarefação capilar funcional no músculo esquelético e pele (316 ± 60 e 353 ± 93 capilares/mm²; 319 ± 56 e 384 ± 70 capilares/mm², $p < 0,05$, respectivamente) em relação ao grupo controle hipertensos (231 ± 11 e 248 ± 14 capilares/mm²). A análise histológica mostrou que o grupo SHR apresentaram uma menor relação capilar/fibra no músculo esquelético (WKY + VEI $1,94 \pm 0,09$ e SHR + VEI $1,46 \pm 0,05$ capilar/fibra no músculo, $P < 0,05$) e o tratamento com EG reverteu a rarefação capilar estrutural nos animais tratados com a dose de 200 mg/kg. A relação capilar/fibra no ventrículo esquerdo de SHR também foi reduzida (WKY + VEI $0,27 \pm 0,08$ e SHR + VEI $0,20 \pm 0,01$, $P < 0,05$). Tratamentos com EG não teve efeito na rarefação capilar estrutura do ventrículo esquerdo. **Conclusão:** O tratamento crônico com EG foi capaz de reduzir a pressão sistólica e capaz de reverter completamente a rarefação capilar funcional e estrutural, na dose mais alta, em animais espontaneamente hipertensos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Antihypertensive and microcirculatory effects of hydro-alcoholic extract of *Echinodorus grandiflorus* (leather hat) in spontaneously hypertensive rats.

ABSTRACT

Introduction: Hypertension is a major challenge to public health, and when untreated, predisposes to cardiovascular morbidity and premature death. It is known that most of the increase in vascular resistance in hypertension, cause of damage to target organs is determined in the microvascular level and recent evidence suggests that a reduction in capillary density may contribute significantly to the elevation of vascular resistance and, consequently, the blood pressure both in humans and in animals for experimentation. The *Echinodorus grandiflorus* (EG), a plant and distributed throughout Brazil, has been used in folk medicine for treating hypertension and inflammatory diseases. However, no pharmacological studies on the biological effects of the extract. **Objectives:** Investigate the effects of an extract *Echinodorus grandiflorus* on the structural and functional capillary density of the skin, skeletal muscle and heart in spontaneously hypertensive rats. **Methods:** For that, we purpose used 10 Wistar-Kyoto (WKY) and 40 SHR animals. The animals were divided into 5 groups that received vehicle (SHR, the hypertensive and Wistar control group, the normotensive control group) and SHR that received different doses of EG (50 mg/kg, 100 mg/kg and 200 mg/kg) for 28 days by gavage. The systolic blood pressure and heart rate were measured weekly by photoplethysmography. Functional capillary density was evaluated in the gracilis muscle and ear's skin using intravital videomicroscopy after intravenous injection of fluoresceine coupled to dextran. Structural capillary density was studied in the skeletal muscle and left ventricle using histological analysis with a FITC-conjugated Griffonia simplicifolia I lectin, which can identify endothelial cells. **Results:** The oral treatment with EG decreased the systolic blood pressure in the different groups. Treatment with EG 100 and EG 200 completely reversed the capillary rarefaction functional in skeletal muscle and skin (316 ± 60 and $353 \pm 93 \pm$ capillaries/mm²; 319 ± 56 and 384 ± 70 capillaries/mm², $p < 0.05$, respectively) compared to the hypertensive group (231 ± 11 and 248 ± 14 capillaries/mm²). Histological analysis showed that SHR had a lower capillary-to-fiber ratio in the skeletal muscle (WKY + VEI $1,94 \pm 0,09$ and SHR + VEI $1,46 \pm 0,05$ capillary/fiber muscular, $P < 0.05$) and EG reversed structural capillary rarefaction in animals treated with a dose of 200 mg/kg. Capillary volume density-to-fiber volume density ratio in the left ventricle of SHR was also reduced (WKY + VEH 0.27 ± 0.08 and SHR + VEH 0.20 ± 0.01 , $P < 0.05$). Treatments with EG had no effect on structural capillary rarefaction. **Conclusion:** The chronic treatment with EG was able to reduce systolic pressure and able to completely reverse the capillary rarefaction functional and structural, at highest dose, in spontaneously hypertensive animals.

LISTA DE ABREVIATURAS

COX	Ciclooxigenase
DCE	Densidade Capilar Estrutural
DCF	Densidade Capilar Funcional
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
EG	<i>Echinodorus grandiflorus</i>
ET-1	Endotelina
FC	Frequência cardíaca
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
iECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotideo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão Arterial Sistólica
SHR Hipertensos	<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> - Ratos Espontaneamente Hipertensos
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1.1.1.1 – Fotografia da espécie *Echinodorus grandiflorus*

Figura 1.1.1.2 - Estrutura química do principal metabólito secundário encontrado nas folhas de *Echinodorus grandiflorus*: ácido echinóico

Figura 1.3 – Estrutura do leito capilar mesentérico

Figura 3.1 - Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico (padrão) nos comprimentos de ondas de 240 e 340 nm por CLAE.

Figura 4.1 – Pressão arterial sistólica basal e após tratamento com EG

Figura 4.2.1 – Imagens representativas da videomicroscopia intravital da pele e do músculo grácil (MG).

Figura 4.2.2 – Densidade capilar funcional no músculo esquelético.

Figura 4.3.1 – Imagens representativas de fotomicrografias adquiridas utilizando microscopia fluorescente para avaliação histológica da densidade capilar estrutural com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada à FITC-conjugado.

Figura 4.3.2 - Relação capilar/fibra no músculo esquelético

Figura 4.3.3 - Relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras no ventrículo esquerdo

Figura 4.4 - Relação VE/Massa corporal (mg/g)

Tabela 3.6 – Densidade de volume de capilares nos Grupos de Animais.

Tabela 4.1.1 – Pressão arterial sistólica basal e após tratamento crônico em diferentes grupos

Tabela 4.1.2 – Pressão arterial sistólica com tratamento crônico de EG em diferentes grupos

Tabela 4.1.3 - Efeitos do tratamento na frequência cardíaca

Tabela 4.2.1 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Funcional.

Tabela 4.3.1 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Grácil.

Tabela 4.3.2 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Miocárdio

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Ao longo dos anos, os produtos naturais têm contribuído enormemente para o desenvolvimento de importantes drogas terapêuticas utilizadas atualmente na medicina moderna (1-3). A busca por novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de plantas tem levado à descoberta de muitas drogas clinicamente úteis, que desempenham um papel importante no tratamento de doenças humanas (3, 4).

Drogas produzidas a partir de produtos naturais podem ajudar a reduzir o impacto da doença cardiovascular, sendo que mais da metade das drogas disponíveis são utilizadas para tratamento de doenças cardiovasculares (5). A sua enorme diversidade química, a crescente disponibilidade de técnicas de isolamento e identificação e a introdução de exames toxicológicos para detectar moléculas potencialmente promissoras em um tempo razoável, são argumentos adicionais em favor do desenvolvimento de produtos naturais como fonte terapêutica (6, 7).

Produtos naturais tem sido uma fonte fértil para a produção de fármacos anti-hipertensivos. Os inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores betas e antagonistas da angiotensina II, apesar de obtidos por síntese, são exemplos de medicamentos que devem muito de sua descoberta a um farmacóforos de ocorrência natural (5).

O tratamento da hipertensão arterial com produtos derivados de plantas está bem documentado. Regiões do Mediterrâneo têm uma incidência significativamente menor de doenças cardiovasculares, quando comparado a outros países europeus. Esse fenômeno tem sido associado com o uso de azeite virgem, que é um dos principais componentes da dieta mediterrânea (8). Vários estudos têm mostrado que a ingestão de óleo de oliva reduz a hipertensão arterial. A atividade cardioprotetora do azeite é atribuída aos seus componentes menores, tais como α -tocoferol, polifenóis e outros compostos fenólicos (9). Mecanismos subjacentes à ação cardioprotetora de azeite incluem um aumento da geração de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio, tais como o óxido nítrico (NO) (10) e prostaciclina (11).

1.1.1 ECHINODORUS GRANDIFLORUS

Nas diferentes regiões existentes no Brasil, metade das espécies nativas apresenta alguma propriedade medicinal. Entre os diversos exemplos de substâncias provenientes de plantas e de importância, podem-se mencionar os extratos de *Echinodorus grandiflorus*, que é conhecido no Brasil como "chapéu couro", devido a sua semelhança morfológica com o couro, tem sido utilizado como um medicamento para tratar doenças inflamatórias e como um agente diurético (12), sendo bastante utilizado na medicina popular, além de servir como base para a fabricação de refrigerantes (Mineirinho®) (13).

A espécie *Echinodorus grandiflorus* é uma planta nativa amplamente dispersa por quase todo o território brasileiro, pertence à família Alismataceae e ao gênero *Echinodorus*. São herbáceas perenes, aquáticas emergentes, mantém suas partes inferiores imersas e expõem suas folhas e inflorescência que ocorrem principalmente nas margens de rios, lagos, canais de drenagem e baixadas pantanosas conseguindo sobreviver totalmente imersas por um certo período de tempo. Toleram curtos períodos de seca, suas flores são brancas com manchas amareladas na parte basal, apresentam infrutescências arredondadas de coloração castanha na maturação (14).



Figura 1.1.1.1- Fotografia da espécie *Echinodorus grandiflorus*. Adaptado de <http://wildplants.net/Ee/Echinodorus%20grandiflorus.html>.

Os principais constituintes químicos encontrados nessa família foram os alcalóides, taninos, flavonóides, triterpenos, glicosídeos, equinodorosídeos, essências e sais minerais (15). Manns e Hartmann (1988) concluíram que o princípio ativo da planta é um diterpeno, chamado de "echinodol" (ácido echinóico) (Fig. 1), metabólito secundário, obtido através de extração metanólica de folhas secas da planta, à baixa temperatura.

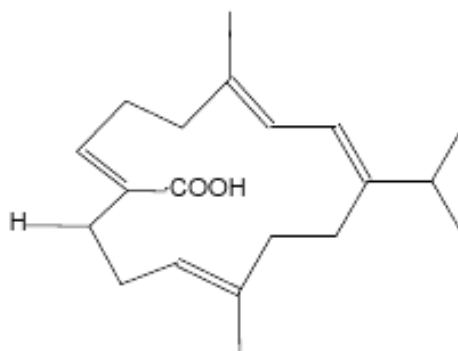


Figura 1.1.1.2 - Estrutura química do principal metabólito secundário encontrado nas folhas de *Echinodorus grandiflorus*: ácido echinóico.

Em modelos experimentais de nocicepção, o extrato metanólico de *Echinodorus grandiflorus* possui propriedades analgésicas central e periférica. A atividade analgésica periférica foi demonstrada pelos efeitos inibitórios das contorções abdominais e dos tempos de lambida da pata. Além da atividade antinociceptiva, o teste do tempo da lambida da pata também indicou uma possível atividade anti inflamatória (16).

Estudos demonstraram que o extrato de *Echinodorus macrophyllus* produzia uma inibição de anticorpos, determinado pelo título de hemaglutinação, reduzindo a infiltração de leucócitos subcutâneos. Em linhagens de células J774, incubadas com LPS, o extrato inibiu a produção de NO. Esses resultados sugerem que o extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* contém substâncias químicas que podem atuar como agentes imunossupressores em doenças autoimunes reumáticas, tais como na artrite reumatóide (17).

Foi demonstrado que diversos terpenóides isolados de plantas de mesma família (gênero *Alisma*), tais como o Alismol e o alisol C, possuem atividade cardiovascular. Por exemplo, alismol, um sesquiterpenóide isolado do rizoma de

Alisma orientale Juzepczuk (18, 19) induzem relaxamento da aorta pré-contraída com K^+ ou pela angiotensina. O Alismol também induz efeito vasodilatador em artérias de coelho, inibindo a liberação de noradrenalina nas terminações nervosas adrenérgicas (20). O Alismol apresentou efeito anti-hipertensivo, em diversos modelos de hipertensão arterial, incluindo a de origem genética (ratos espontaneamente hipertensos – SHR), reduzindo a pressão arterial e a contratilidade vascular e cardíaca por ação em canais de Ca^{2+} , o que justificaria a sua utilização na medicina popular (18); (19).

Em ratos SHR, o tratamento intravenoso (i.v.) com extrato etanólico nas doses de 3 a 100 mg/kg reduziu a pressão arterial em $51 \pm 6\%$. Em estudos mais recentes, a ação vasodilatadora do extrato bruto de *E. grandiflorus*, em ratos SHR, também foi confirmada (21). Estudos demonstraram os mecanismos fisiológicos envolvidos no efeito vasodilatador de extratos de *E. grandiflorus* (EG) em anéis de aorta de coelho, este efeito parece ser mediado por óxido nítrico e receptores de PAF. Este efeito vasodilatador foi também demonstrado em artéria isolada de coelho. Mais ainda, o efeito anti-hipertensivo dos EG também já foi demonstrado *in vitro* (21, 22).

Entre os poucos dados disponíveis na literatura em relação ao efeito diurético da espécie, podemos citar o trabalho de Ribeiro e col. (1988) (23) onde foi verificado que a administração do extrato bruto das folhas de *E. grandiflorus* induzia diurese em ratas. Um trabalho mais recente de Cardoso e col. em 2003 (24) confirma essas observações obtidas com o extrato bruto, pois foi verificado que o chá das folhas de *E. grandiflorus* administrado por gavagem também aumenta a produção de urina em camundongos.

Porém, os benefícios do tratamento com EG sobre a microcirculação e, conseqüentemente, sobre a reversão da lesão em órgãos-alvo causada pelo aumento crônico da pressão arterial na hipertensão ainda não foram demonstrados.

1.2 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A elevação da pressão arterial representa um fator de risco independente, linear e contínuo para doença cardiovascular (25). A hipertensão arterial apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas

complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica (26).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 600 milhões de pessoas no mundo tenham hipertensão arterial sistêmica. No continente americano a hipertensão afeta cerca de 140 milhões de pessoas, metade das quais desconhece ser portadora da doença por não apresentar sintomas e não procurar serviços de saúde, e dentre as pessoas que se descobrem hipertensas, 30% não realizam o tratamento adequado por falta de motivação ou de recursos financeiros próprios (WHO 2002).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil – com base nos dados do programa HIPERDIA (Sistema de Cadastramento e Acompanhamento de Hipertensos e Diabéticos. <http://hiperdia.datasus.gov.br/>) que integra desde janeiro de 2002 o Plano de Reorganização da Atenção à Hipertensão Arterial e ao Diabetes Mellitus - em setembro de 2005 estavam cadastradas 5.058.777 pessoas, das quais 74,2% tinham hipertensão arterial isolada, e 21,9% hipertensão arterial sistêmica associada ao diabetes mellitus. A Sociedade Brasileira de Hipertensão constata que a prevalência de hipertensão arterial sistêmica na população adulta varia de 35,8% nos homens e 30% em mulheres (26).

Há ainda muita incerteza sobre a fisiopatologia da hipertensão. Entretanto, quando não se encontra uma única causa conhecida chamamos de “hipertensão essencial”. Uma série de mecanismos está envolvido na manutenção da pressão, e sua perturbação pode desempenhar um papel no desenvolvimento da hipertensão arterial (27).

Em condições normais, o controle da pressão arterial (PA) envolve grande número de substâncias e sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e com redundância para manter a PA em níveis adequados, nas mais diversas situações fisiológicas. A PA é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, sendo determinado por volume sistólico e frequência cardíaca, e pelo tônus vascular, respectivamente, de tal forma que seu controle envolve mecanismos neurais e neuro-humorais que, em curto e longo prazo, modulam não só a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, como também o volume sanguíneo e a secreção de vários hormônios como renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial, entre outros (28, 29) destacando-se o papel do rim e do sistema endotelial (30).

CONTROLE DA PA ENVOLVE FATORES NEURO-HUMORAIS E SISTEMAS FISIOLÓGICOS



Figura 1.2.1 – Controle da Pressão Arterial

1.2.1 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Historicamente o estudo sobre o endotélio vascular começa em 1980, quando Furchgott e Zawadsky descreveram o papel do endotélio intacto para a vasodilatação induzida pela acetilcolina. Pouco tempo depois, o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) foi identificado como óxido nítrico (NO) (31). Em adição, as células endoteliais produzem o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), além de produzir fatores vasoconstritores incluindo pequenos peptídeos como as endotelinas ou angiotensina II, assim como as prostaglandinas H_2 ou tromboxanos A_2 (32).

A disfunção endotelial é definida como a incapacidade de artérias e arteríolas de se dilatarem em resposta a um estímulo apropriado (33), sendo observada na presença dos principais fatores de risco das doenças cardiovasculares (34). A presença da disfunção endotelial é sugerida por aumentar a susceptibilidade para desenvolver a hipertensão (35). Em condições normais, o endotélio induz a produção e liberação de NO – sintetizado pela óxido nítrico sintase (NOS) a partir da L-arginina - que é difundido para tecidos e células vizinhas, exercendo seu papel cardioprotetor, aumentando a concentração intracelular de GMPc, levando ao relaxamento da musculatura lisa (36); prevenindo a adesão e migração de leucócitos; proliferação de células musculares lisas; adesão e agregação plaquetária, e expressão de moléculas de adesão (37, 38).

Uma característica central da Hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a disfunção endotelial, um fenômeno que, apesar de discutido se primário ou secundário à HAS (39), é fundamental na sua gênese e manutenção, e é acompanhada de mudanças estruturais (hipertrofia da parede arterial e aumento da relação parede/lúmen) e funcionais (síntese e liberação de fatores vasoativos) do sistema vascular em resposta a mudanças nas condições hemodinâmicas.

Na disfunção endotelial da HAS, o papel central reside no impedimento da vasodilatação causado pela menor bioatividade do NO na parede vascular, devido ao estresse oxidativo, onde as espécies reativas de oxigênio, principalmente os ânions superóxidos são produzidos por uma enzima de cadeia respiratória mitocondrial, a NADH, que parece ser a maior fonte de ânion superóxido, além da ciclooxigenase (COX) (40). Os ânions superóxidos são altamente reativos e destroem NO, reduzindo sua biodisponibilidade e produzindo peroxinitrito (37), que tem vários efeitos negativos sobre a estrutura e função vascular (41), além de poder agir como vasoconstritor (42).

No quadro hipertensivo, a redução da disponibilidade de NO é parcialmente compensada pela ativação de vias alternativas, incluindo a produção e liberação de fatores contráteis derivados do endotélio (EDHFs) que contribuem para a manutenção da vasodilatação dependente do endotélio (43). Nesta condição, uma complexa interação entre NO e endotelina-1 (ET1) pode contribuir para o estabelecimento da disfunção endotelial. Desta forma, apesar de ter níveis normais na circulação de ET-1, pacientes hipertensos apresentam uma atividade vasoconstritora aumentada do peptídeo na circulação periférica que corresponde à diminuição da disponibilidade de NO (44). Em nível vascular, ET-1 liga-se e exerce os seus efeitos através dos seus receptores específicos ETa e ETb (35). Em particular, o ETa estão localizados principalmente na célula muscular lisa e estimula a contração e hipertrofia vascular (45). Pelo contrário, o ETb são representados nas células musculares lisa, mas são abundantes nas células endoteliais e medeiam a liberação de NO, assim, inibir a vasoconstrição e proliferação celular (45). Na presença da disfunção endotelial, a ativação dos receptores ETb não são capazes de aumentar a vasodilatação mediada por NO e a contração resultante do efeito da endotelina é aumentada (45). Este fenômeno é ainda favorecido pela redução do efeito inibitório do NO na produção e atividade de ET-1 (46).

Investigações em modelos experimentais de hipertensão arterial mostraram que a vasodilatação dependente do endotélio encontra-se acentuadamente reduzida na maioria deles, embora os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial variem conforme o modelo utilizado.

Uma diminuição da biodisponibilidade de NO é observado em pacientes hipertensos e em alguns modelos de hipertensão, incluindo os ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Há evidências que demonstram a disfunção endotelial em SHR, que é causada pela inativação oxidativa do NO (47). Mais ainda, vem sendo observada uma produção exagerada de ânions superóxido pela parede vascular dos SHR. Zalba e col (2001) demonstraram que a atividade NADH/NADPH oxidase está aumentada anormalmente na parede aorta de SHR com diminuição do relaxamento dependente do NO (48).

1.3 MICROCIRCULAÇÃO

A microcirculação compreende vasos com diâmetros menores que 150 μm . Portanto, inclui arteríolas, capilares e vênulas. As pequenas arteríolas controlam o fluxo sanguíneo para cada área tecidual e as condições locais controlam, por sua vez, o diâmetro das arteríolas. Cada artéria nutrizante, ao chegar a um órgão, ramifica-se seis a oito vezes antes dos ramos se tornarem suficientemente pequenas e serem denominados arteíolas (49) (Figura 2).

Os capilares apresentam uma única camada de células endoteliais sobre uma membrana basal e possuem diâmetros que variam entre 2 e 9 μm , no entanto já foi demonstrado que 50% dos capilares possuem diâmetros inferiores a 4,5 μm (49). São provenientes de ramificações das metarteríolas, que podem originar em média uma dezena de capilares cada uma, podendo conter em suas bifurcações os esfíncteres pré-capilares, estruturas musculares que circundam a entrada dos capilares, controlando a entrada de sangue para cada capilar (49).

A função primária da microcirculação é otimizar o suprimento de nutrientes e oxigênio para os tecidos em resposta as variações sobre a demanda e a remoção dos produtos de excreção das células. Uma segunda função importante é evitar grandes flutuações da pressão hidrostática ao nível de capilares, causando distúrbios nas trocas nos capilares. É na microcirculação que ocorre uma substancial

proporção da queda da pressão hidrostática. A microcirculação é extremamente importante na determinação da resistência periférica vascular total (50-52).

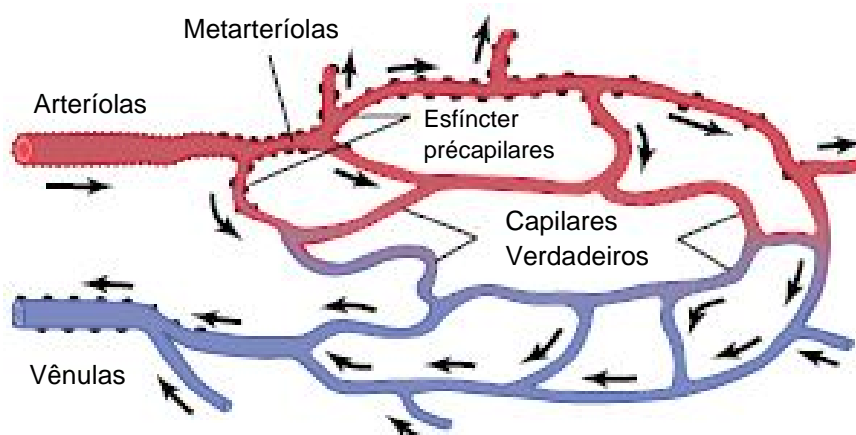


Figura 1.3 – Estrutura do leito capilar mesentérico. Adaptado de Guyton, 2006.

1.3.1 RAREFAÇÃO CAPILAR NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

Na hipertensão, a estrutura e a função da microcirculação podem ser alteradas, ao menos, de três maneiras. Primeiro, o mecanismo de regulação do tônus vasomotor pode ser anormal, levando a um aumento da vasoconstrição ou uma redução da vasodilatação. Em segundo lugar, pode haver alterações anatômicas na estrutura de cada um dos vasos de resistência pré-capilares, como um aumento na relação vaso-lúmen. Finalmente, pode haver alterações ao nível da rede microvascular, talvez que impliquem uma redução na densidade (rarefação) das arteríolas ou capilares dentro de um determinado leito vascular (53).

A observação mais consistente tem sido a rarefação microvascular. A redução no número dos microvasos vem sendo descrita por muitos anos na maioria das formas de hipertensão clínica e experimental (51).

Tem sido sugerido que a rarefação ocorre em duas fases (Prewitt RL e col. 1990). A primeira fase da rarefação funcional envolve a constrição dos microvasos ao ponto de não perfusão, possivelmente como um resultado ao aumento do estímulo vasoconstritor. Os vasos não perfundidos podem então desaparecer, levando a uma segunda fase, a rarefação estrutural ou anatômica. Em pacientes com hipertensão primária, a redução na densidade de capilares na pele do dorso

dos dedos recentemente demonstrou ser resultado da rarefação anatômica, em vez da rarefação funcional (54).

Inúmeros modelos animais e humanos com hipertensão arterial primária exibem uma redução da densidade de microvasos em tecidos como músculo esquelético, pele, conjuntiva e miocárdio. A rarefação estrutural ou anatômica, leva ao aumento da resistência vascular periférica e diminui a entrega de oxigênio aos tecidos (55), agravando a hipertensão e provocando lesões a órgãos alvos (56). Evidências indicam que a rarefação microvascular está associada com a patogênese da hipertensão e pode estar acompanhada pela morte de células parenquimais (57, 58). Evidências indicam que o aumento da apoptose em células endoteliais dos microvasos pode causar a hipertensão em pacientes, no entanto, o mecanismo ainda está sobre investigação (59, 60).

1.4 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS E A MICROCIRCULAÇÃO

O tratamento medicamentoso visa a reduzir os níveis de pressão como também a redução de eventos cardiovasculares. A redução da PA para valores inferiores a 130 mmHg de pressão sistólica e a 85 mmHg de pressão diastólica pode ser útil em situações específicas, como em pacientes de alto risco cardiovascular, diabetes, insuficiência cardíaca, com comprometimento renal e prevenção de acidente vascular cerebral (26).

Os estudos clínicos em pacientes hipertensos têm sido centrada na redução da pressão arterial, vasodilatação e vasoconstrição, reologia vascular, rigidez vascular e da reversão dos danos a órgãos-alvo como coração, rins, cérebro e artérias. Poucos estudos têm explorado os efeitos das drogas anti-hipertensivos sobre a microcirculação. O tratamento a longo prazo com anti-hipertensivo em pacientes hipertensos não-diabético, aumenta a densidade capilar em comparação com pacientes não tratados (61).

Estudos recentes com pacientes hipertensos confirmam que a terapia anti-hipertensiva pode reverter à rarefação funcional e estrutural de capilares da pele (61). Estudos anteriores concluíram que agentes anti-hipertensivos que agem como vasodilatadores são eficazes em melhorar a estrutura microvascular, enquanto que agentes que agem reduzindo o débito cardíaco não são eficazes (53, 62).

Uma grande variedade de agentes farmacológicos pode efetivamente diminuir a PA em hipertensos, eles variam na sua capacidade de reverter mudanças estruturais e funcionais na microcirculação (53, 63), e para prevenir as lesões a órgãos alvos, podendo levar à reversão da rarefação vascular ou reduzir a relação parede-luz de pequenas artérias (53).

A maioria das classes de agentes anti-hipertensivos amplamente utilizados foi investigada no que diz respeito aos parâmetros estruturais em estudos com animais, e claras diferenças surgiram entre eles. O tratamento crônico com bloqueadores α_1 pode levar ao aumento na densidade capilar no músculo esquelético de ratos (53). O efeito sobre a densidade dos microvasos pode estar relacionada ao aumento do *shear stress* associado com a vasodilatação.

Os antagonistas de cálcio têm demonstrado aumentar a densidade dos microvasos em inúmeros modelos animais (64). Em SHR, a nifedipina induziu o crescimento na rede de capilares coronários (65). Nifedipina e amlodipina aumentam os níveis de VEGF e assim induzem a formação *in vitro* de capilares a partir de células endoteliais (66) e aumenta a densidade capilar total em coração de hamster (67). Antagonistas de cálcio inibem a contração do músculo liso vascular produzindo vasodilatação e melhorando a estrutura microvascular, incluindo a redução da relação parede-lúmen de artérias de resistência (53). Estudos recentes demonstram que a nifedipina aumentou significativamente a densidade capilar no músculo grácil e na pele de SHR (68).

Inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) bloqueiam a conversão da angiotensina I em angiotensina II, levando a redução da pressão arterial e a relação parede-luz, além de alterar a estrutura e densidade de microvasos (51, 69, 70). A situação em relação aos efeitos dos inibidores da ECA sobre a estrutura e a densidade microvascular é complexa e tem sido objeto de diversos estudos. Um aumento marcante na atividade da ECA tem sido demonstrado nas paredes das arteríolas de músculo periférico em SHR, e quando tratados com inibidores da ECA não inibem totalmente a sua atividade (71). Parece que a inibição da ECA pode reduzir a razão parede-lúmen das arteríolas aferentes renal em ratos geneticamente hipertensos (72). Sabino e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com enalapril reverte a rarefação capilar estrutural no músculo grácil e no coração de SHR, sugerindo a indução de um efeito pró angiogênico.

Em alguns estudos o tratamento com captopril reduziu a área da seção transversa de aortas e arteríolas em ratos hipertensos, e reduziu o número de pequenas arteríolas (73), assim como a relação capilar-fibra em membros inferiores isquêmicos de ratos (74). Estudos com benazepril, com a metodologia da câmara dorsal, reduziram tanto a densidade arteriolar e a densidade de pequenas veias na microcirculação da pele de ratos SHR (75). A supressão do sistema renina-angiotensina promove a rarefação microvascular, sugerindo que a angiotensina II tem um grande poder de induzir a angiogênese (73).

Vários estudos têm demonstrado que bloqueadores dos receptores AT₁ para angiotensina II aumentam a densidade capilar (76). Quando os receptores AT₁ estão bloqueados a angiotensina II ainda exerce seu efeito via receptor AT₂, que pode incluir a liberação de cininas e do NO – moléculas que medeiam a angiogênese (77). Em um modelo de rarefação capilar renal peritubular em ratos Sprague-Dawley, o losartan reverteu a rarefação via aumento da expressão de VEGF (78). Estudos demonstram que o losartan reverte a rarefação capilar no músculo grácil e no ventrículo esquerdo de SHR (68).

Apesar dos importantes e crescentes avanços no diagnóstico e tratamento da doença hipertensiva, a hipertensão arterial continua sendo uma das principais causas de morbi-mortalidade mundial. Por isso a capacidade do extrato de EG de induzir redução significativa dos níveis pressóricos deveria ter como alvo privilegiado a prevenção e/ou reversão das modificações funcionais e estruturais da microcirculação.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do tratamento crônico do extrato hidro-alcólico de EG sobre a hipertensão arterial e sobre as alterações microcirculatórias de ratos espontaneamente hipertensos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Investigar os efeitos anti-hipertensivos do tratamento oral crônico com o extrato hidro-alcólico de EG (50, 100 e 200 mg/kg) em SHR acordados;

2 - Investigar os efeitos do tratamento com o extrato hidro-alcólico de EG através de microscopia intravital sobre a densidade capilar funcional na pele e no músculo esquelético de SHR;

3 – Investigar os efeitos do tratamento com o extrato hidro-alcólico de EG através de microscopia de fluorescência sobre a densidade capilar estrutural no músculo esquelético e no ventrículo esquerdo de SHR;

4 – Investigar os efeitos do tratamento com o extrato hidro-alcólico de EG sobre a hipertrofia do ventrículo esquerdo;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Folhas de *E. grandiflorus* foram recolhidos em Tanguá, Rio de Janeiro, Brasil. O extrato hidro-alcólico de *E. grandiflorus* foi preparado pela Dra. Raquel Figueiredo no Laboratório de Química de produtos naturais PN3, Farmanguinhos/FIOCRUZ.

Após avaliação do perfil cromatográfico e biológico dos extratos etanólico e aquoso do material vegetal obtido da Herbarium Laboratório Botânico (Lote nº 1844B1), foram adquiridos 15 kg de *E. grandiflorus* (chapéu-de-couro).

Uma alíquota de 512 g desse material foi extraída por maceração dinâmica com 5 L de uma solução EtOH/H₂O 50% por 48 h. O extrato hidroalcoólico foi concentrado a pressão reduzida em evaporador rotatório e posteriormente liofilizado até *secura*, obtendo-se um rendimento de 9,4%.

De acordo com as sugestões da comissão de avaliação do PDTIS, o desenvolvimento foi direcionado para extrato hidroalcoólico das folhas de *E. grandiflorus*. O perfil químico desse extrato por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode ser visto na Figura 3.1.

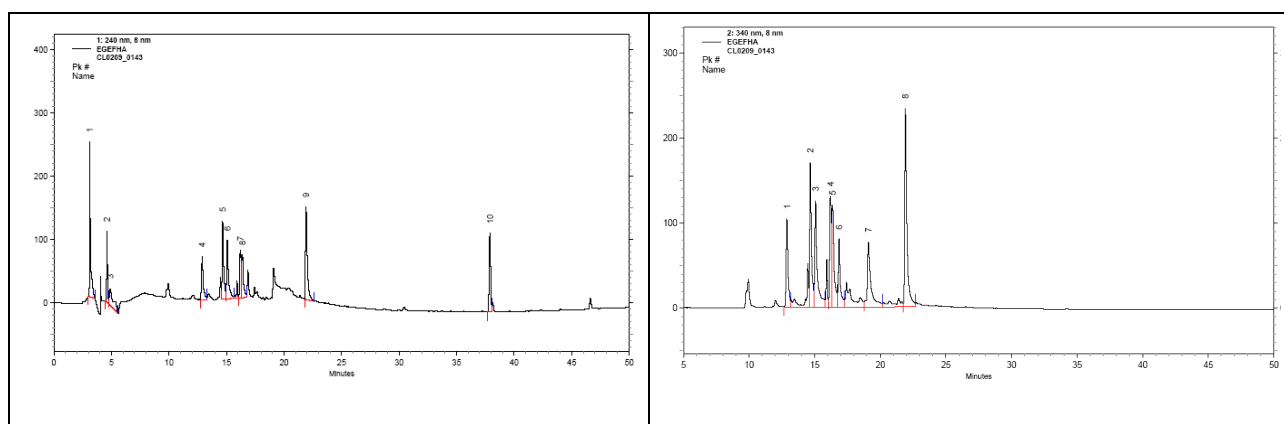


Figura 3.1 - Perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico (padrão) nos comprimentos de ondas de 240 e 340 nm por CLAE.

3.2 Modelos Animais

Foram utilizados SHR machos da linhagem de Okamoto (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil) adultos, com 12 a 14 semanas de idade 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 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) com acesso livre à 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 0010).

Quarenta SHR foram divididos de maneira aleatória em 4 grupos (10 animais por grupo) e tratados durante 28 dias por gavagem com veículo (SHR + VEI, grupo controle) e um extrato hidroalcoólico de *Echinodorus grandiflorus* (EG) (SHR + EG, 50 mg/kg/dia, SHR + EG, 100 mg/kg/dia e SHR + EG, 200 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).

3.3 Medidas Hemodinâmicas

Foram realizadas medidas da pressão arterial sistólica (57) e diastólica em animais conscientes, através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, Visitech, EUA), um método não invasivo de medida da PA. A partir destas medidas este sistema calcula a pressão arterial média destes animais.

Assim, pelo menos uma semana antes da medida da PA, os ratos eram adaptados por 3 dias consecutivos neste aparelho de pressão caudal pré-aquecido para a aclimação. A PA foi medida antes do início do tratamento e uma vez por semana até o final do tratamento.

3.4 Microscopia Intravital por Fluorescência

Ao fim do tratamento, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (75 mg/kg) administrado por via intraperitoneal; a anestesia foi complementada por administração intravenosa 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 de 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 $38 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ através de um sistema de aquecimento homeotérmico (Harvard Apparatus, Boston, MA, EUA).

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, de modo que permanecesse sob o feixe de luz. Para a avaliação da microcirculação cutânea, a pele da orelha foi raspada com creme depilatório para a remoção dos pêlos e a seguir, os animais foram colocados sob o microscópio, de modo que a orelha permanecesse sob o feixe de luz.

Utilizou-se um microscópio intravital de base fixa (Olympus BX51/WI, EUA) acoplado a um sistema de câmera de vídeo digital (Optronics, Goleta, CA, EUA). 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 4% (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 programa 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 mm^2 e, nesta área, foram contados todos os capilares espontaneamente perfundidos durante um período de 1 minuto. 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 programa 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 Millonig para análises morfológicas.

3.5 Avaliação da hipertrofia do ventrículo esquerdo

Após a morte dos animais (KCl a 10%) o coração foi retirado para a análise imediata da massa do ventrículo esquerdo (VE). Para esta análise, foi utilizado o método de Scherle que registra a massa do órgão pelo peso que o mesmo impõe quando submerso em água (79). O VE foi suspenso por um fio com o auxílio de uma haste fixa e submerso em um copo de béquer com solução salina sobre uma balança analítica, sendo representada pela relação VE/massa corporal (mg/g).

3.6 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 emblocadas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5 μm 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 45 min.

A densidade capilar estrutural (número de capilares por mm^2) e a densidade de fibras (número de fibras musculares por mm^2) do músculo esquelético foram determinadas e analisadas usando o programa Saisam e o microscópio de

fluorescência (Olympus BX51 and Fluoview SV 300 scanning unit, Olympus, EUA) 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 7 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 (80). 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 densidade de volume de capilares ($Vv[cap]$) e a densidade de volume de fibras ($Vv[fib]$) foram determinadas utilizando o método do “intercepto do ponto-amostrado” anteriormente descrito por Gundersen & Jensen (81) 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 64 pontos-teste foi superposto em cada campo microscópico, com o auxílio do programa Saisam 5.1.3.

A densidade de volume de capilares ($Vv[cap]$) foi calculada da seguinte forma: $Vv[cap] = Pp / PT$ (%), onde Pp é o número de pontos-teste que superpõem capilares e PT é o número total de pontos-teste ($PT = 64$ 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 ($Vv[cap] / Vv[fib]$) foi então diretamente calculada.

O número total de pontos analisados por grupo foi de 3920, ou seja, 15 campos microscópicos de três seções do tecido para cada animal e dez animais por grupo, utilizando um sistema-teste com 64 pontos. Skyschally e colaboradores mostraram que podemos utilizar a seguinte fórmula para avaliarmos se o tamanho da amostra em um estudo estereológico deste tipo está adequado (82):

$$EPR = \frac{\sqrt{1 - Vv}}{N}$$

Sendo:

EPR – Erro padrão relativo

Vv – densidade de volume da estrutura em análise

n – número de pontos a serem contados

Tabela 3.6 – Densidade de volume de capilares Grupos de Animais ($n = 10$).
Densidade de volume de capilares média após 28 dias de tratamento

Grupos de Animais ($n = 10$)	Densidade de volume de capilares média após 28 dias de tratamento
WKY + VEI	0,27
SHR + VEI	0,20
SHR +EG 50	0,19
SHR+EG 100	0,16
SHR+EG 200	0,17
Média de todos os grupos	0,19

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), EG 50 (SHR + EG, 50 mg/kg/dia), EG 100 (SHR + EG, 100 mg/kg/dia) ou EG 200 (SHR + EG, 200 mg/kg/dia).

Assim temos:

$$0,05 = \frac{(1 - 0,19)}{n} \quad \text{logo,} \quad n = 324$$

Posto que o $V_v = 0,19$, este só ocupa 19% do tecido, por isso o resultado encontrado $n = 324$ deve ser corrigido para o V_v de nosso material, assim:

$$n \text{ corrigido} = \frac{n \text{ calculado}}{V_v} \quad \text{logo,} \quad n \text{ corrigido} = 1705$$

Ou seja, o mínimo de pontos a serem contados em nossa amostra deve ser de no mínimo 1705. Assim, o número de pontos contados ($n = 3920$) supera bastante este mínimo, sendo considerado adequado para o nosso estudo.

3.7 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. Quando foram detectadas diferenças significativas pelo ANOVA, o teste de Bonferroni foi utilizado para localizar as diferenças estatisticamente significativas. 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, California, EUA).

3.8 Drogas

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

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do tratamento com um extrato de *Echinodorus grandiflorus* na pressão arterial e na frequência cardíaca

No início dos tratamentos, os diferentes grupos de animais SHR apresentavam valores de PAS significativamente aumentados quando comparados com o grupo controle normotenso (WKY + VEI). Além disso, não foi verificada nenhuma diferença significativa nos valores basais de PAS nos diferentes grupos de SHR (Tabela 4.1.1).

Tabela 4.1.1 – Pressão arterial sistólica basal e após tratamento crônico em diferentes grupos

	PAS BASAL (mmHg)	PAS FINAL (mmHg)
WKY + VEI	125 ± 2	123 ± 3
SHR + VEI	187 ± 5	204 ± 3
SHR + EG 50	196 ± 4	171 ± 1*
SHR + EG 100	199 ± 3	152 ± 3*
SHR + EG 200	197 ± 3	138 ± 2*

Pressão arterial sistólica basal (antes do tratamento) e final nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados por gavagem durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), EG 50 (SHR + 50 mg/Kg/dia), EG 100 (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG 200 (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média ± EPM de 10 animais. *P<0,001 vs Basal

O tratamento oral crônico de SHR durante 28 dias com as diferentes doses estudadas de EG foi capaz de normalizar a PAS quando comparados com os normotensos, exceto os animais tratados com EG 50 mg/kg/dia. Já o tratamento dos ratos WKY e SHR com veículo não promoveu alterações dos valores médios de PAS nestes grupos, observados no início do experimento (Tabela 4.1.2).

Tabela 4.1.2 – Pressão arterial sistólica com tratamento crônico de EG em diferentes grupos

	Basal	1 SEM	2 SEM	3 SEM	4 SEM
WKY + VEI	125 ± 3	130 ± 2	125 ± 1	122 ± 3	123 ± 4
SHR + VEI	187 ± 5	200 ± 2	193 ± 3	199 ± 3	204 ± 3
SHR + EG 50	196 ± 5	186 ± 4	181 ± 2	177 ± 2	171 ± 2*
SHR + EG 100	199 ± 3	175 ± 3	171 ± 5	166 ± 2	152 ± 4*
SHR + EG 200	197 ± 4	175 ± 4	166 ± 3	155 ± 3	138 ± 3*

Pressão arterial sistólica basal (antes do tratamento oral) e final nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados por gavagem por 28 dias com veículo (SHR + VEI), EG 50 (SHR + 50 mg/Kg/dia), EG 100 (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG 200 (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média ± EPM de 10 animais. *P<0,001 vs basal

Após 4 semanas de tratamento oral, a administração das doses de EG diminuiu a PAS de maneira dose dependente, e também normalizou os níveis pressóricos, quando comparados com o grupo WKY controle (Figura 4.1).

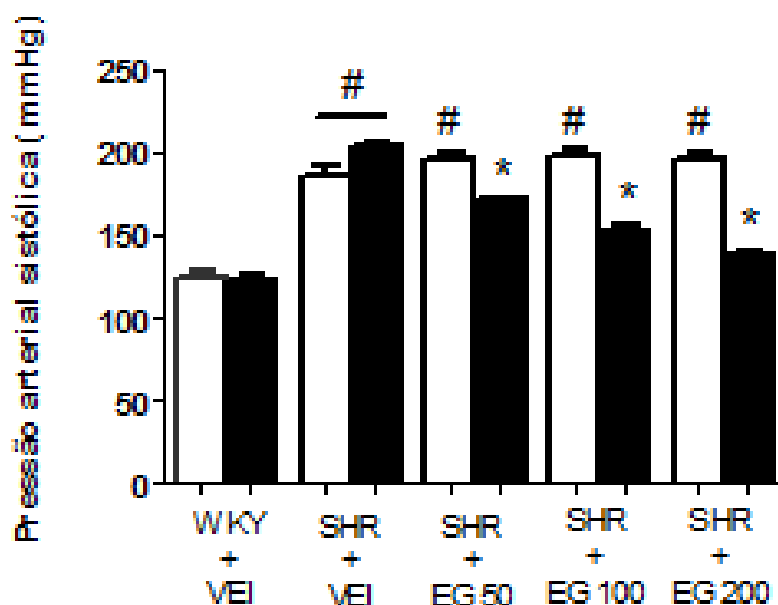


Figura 4.1 – Pressão arterial sistólica basal (barras abertas) e após (barras fechadas) tratamento oral durante 28 dias em ratos hipertensos tratados com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média \pm EPM de 10 animais. * $P < 0,001$ vs PAS basal, # $P < 0,001$ vs WKY.

Não houve diferença significativa entre o basal e o final do tratamento, em relação à frequência cardíaca de todos os grupos (Tabela 4.1.3).

Tabela 4.1.3 - Efeitos do tratamento na frequência cardíaca (antes e após tratamento crônico)

	FC BASAL (bpm)	FC FINAL (bpm)
WKY + VEI	382 ± 7	371 ± 9
SHR + VEI	368 ± 9	366 ± 8
SHR + EG 50	378 ± 10	375 ± 11
SHR + EG 100	370 ± 10	344 ± 10
SHR + EG 200	360 ± 8	382 ± 5

Frequência cardíaca basal (antes do tratamento) e final EPM nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos posteriormente tratados com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média ± EPM de 10 animais.

4.2 Efeitos do tratamento com um extrato de EG sobre a densidade capilar funcional do músculo esquelético e na pele

Através da videomicroscopia fluorescente intravital, foi possível a visualização da rede de capilares no tecido 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, que permite a visualização e a contagem dos capilares nestes leitos vasculares (Figura 4.2.1).

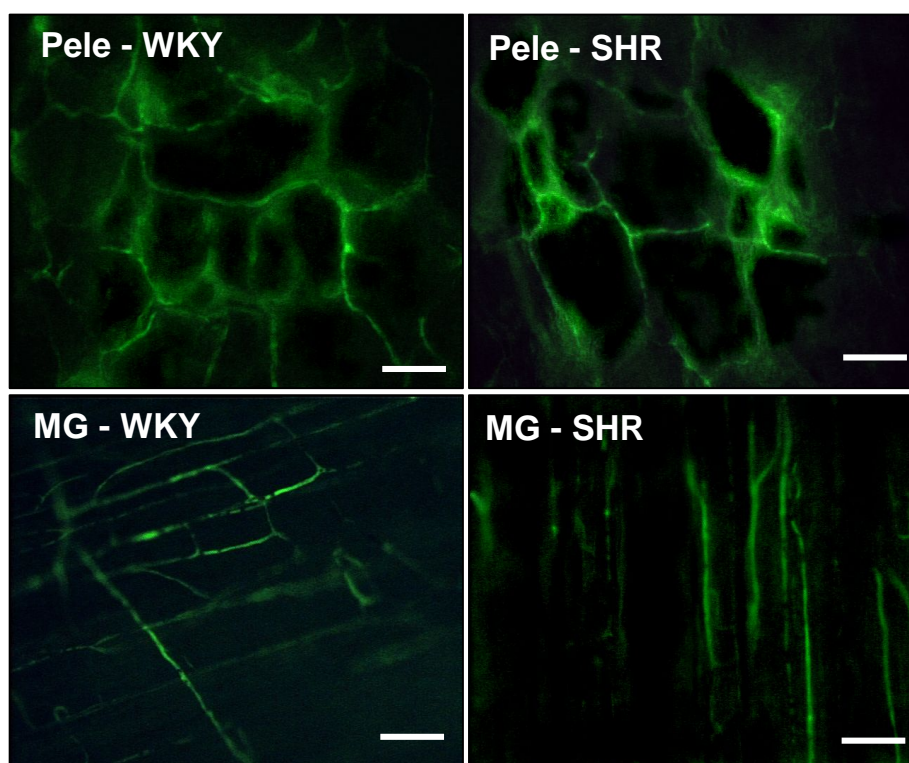


Figura 4.2.1 – Imagens representativas da videomicroscopia intravital da pele e do músculo grácil de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos (SHR + VEI) após a administração intravenosa de fluoresceína-isotiocianato (FITC) dextran (peso molecular 150.000), indicando os capilares. Aumento de 100x, barra = 100 μ m. Imagem cedida por Nascimento, A.R e col, 2008.

Quando comparados com os animais normotensos, o grupo SHR controle mostrou uma densidade capilar funcional significativamente menor tanto no músculo esquelético (WKY + VEI 311 ± 12 e SHR + VEI 231 ± 11 capilares/mm², $p < 0,001$) quanto na pele (WKY + VEI 361 ± 19 e SHR + VEI 248 ± 14 capilares/mm², $p < 0,001$) evidenciando a rarefação capilar funcional característica deste grupo de animais (Figura 4.2.2, Tabela 4.2.1).

O tratamento com EG aumentou significativamente a densidade capilar funcional no músculo grácil e na pele dos animais SHR, revertendo a rarefação capilar. O resultado foi dose-dependente entre os grupos hipertensos tratados com EG (Figura 4.2.2, Tabela 4.2.1).

Tabela 4.2.1 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Funcional.

	DCF Muscular	DCF Cutânea
WKY + VEI	311 ± 12	361 ± 19
SHR + VEI	$231 \pm 11\#$	$248 \pm 14\#$
SHR +EG 50	$253 \pm 17\§$	$275 \pm 13\§$
SHR+EG 100	$316 \pm 19^*$	$319 \pm 18^*$
SHR+EG 200	$353 \pm 29^{**}$	$384 \pm 22^{**}$

Densidade capilar funcional (capilares/mm²) no músculo esquelético e na pele da orelha ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos posteriormente tratados com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média \pm EPM de 10 experimentos. # $p < 0,001$ vs Wistar, * $p < 0,001$ vs SHR, ** $p < 0,001$ vs SHR, § $p < 0,001$ vs Wistar.

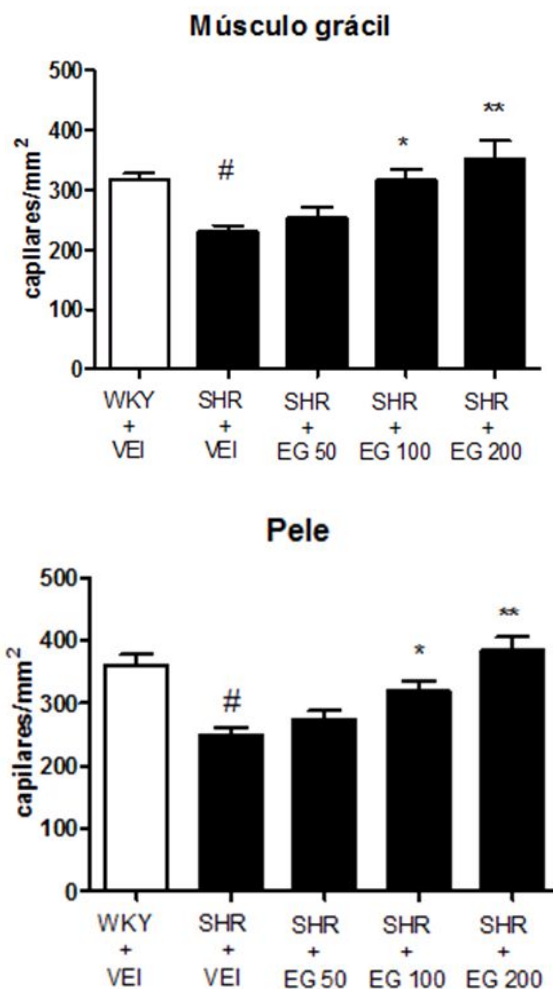


Figura 4.2.2 – Densidade capilar funcional no músculo esquelético (painel superior) e na pele (painel inferior) de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam uma média \pm EPM de 10 animais. # $p < 0,001$ vs WKY + VEI, * $p < 0,001$ vs SHR + VEI, ** $p < 0,001$ vs SHR + VEI.

4.3 Efeitos do tratamento na densidade capilar estrutural do músculo esquelético e do ventrículo esquerdo.

A figura abaixo mostra imagens representativas de fotomicrografias utilizadas para avaliação histológica da densidade capilar estrutural com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada à FITC-conjugado. As características da rede capilar do músculo esquelético permitem sua observação em seções transversais, diferente do ventrículo esquerdo, onde 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.

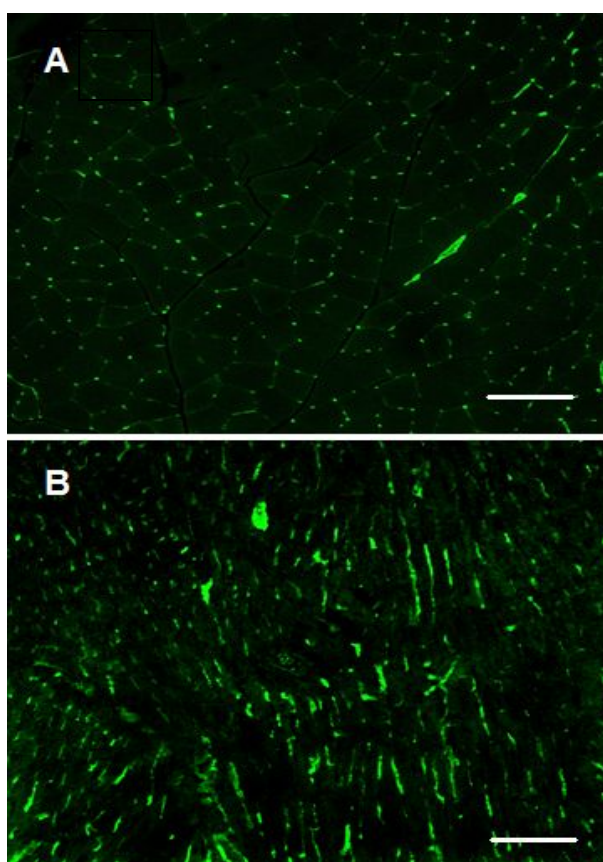


Figura 4.3.1 – Imagens representativas de fotomicrografias adquiridas utilizando microscopia fluorescente para avaliação histológica da densidade capilar estrutural com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada à FITC-conjugado. O arranjo anatômico da rede capilar do músculo esquelético em seções transversais pode ser observado em (A). No ventrículo esquerdo, a densidade capilar estrutural foi avaliada em seções obtidas utilizando o método “orientator”. Aumento 200x, barra = 100 μ m. Imagem cedida por Sabino e col, 2007.

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 $1,94 \pm 0,09$ e SHR + VEI $1,46 \pm 0,05$ capilar/fibra muscular, $p < 0,05$), evidenciando a rarefação capilar estrutural característica deste grupo de animais (Figura 4.3.2, Tabela 4.3.1).

O tratamento com um extrato de EG, em diferentes doses, aumentou a relação capilar/fibra no músculo grácil dos animais SHR. Porém só observamos reversão da rarefação capilar estrutural nos animais tratados com a dose de 200 mg/kg, tendo em vista que não observamos diferença significativa entre os animais normotensos (WKY) e SHR tratados com a dose maior (Figura 4.3.2, Tabela 4.3.1).

Tabela 4.3.1 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Grácil.

Grupo	Relação capilar/fibra no músculo grácil
WKY + VEI	$1,94 \pm 0,09$
SHR + VEI	$1,46 \pm 0,05^*$
SHR + EG 50	$1,59 \pm 0,07$
SHR + EG 100	$1,75 \pm 0,09$
SHR + EG 200	$1,85 \pm 0,12\#$

Relação capilar/fibra no músculo esquelético de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média \pm EPM de 10 animais. * $p < 0,05$ vs WKY; # $p < 0,05$ vs SHR

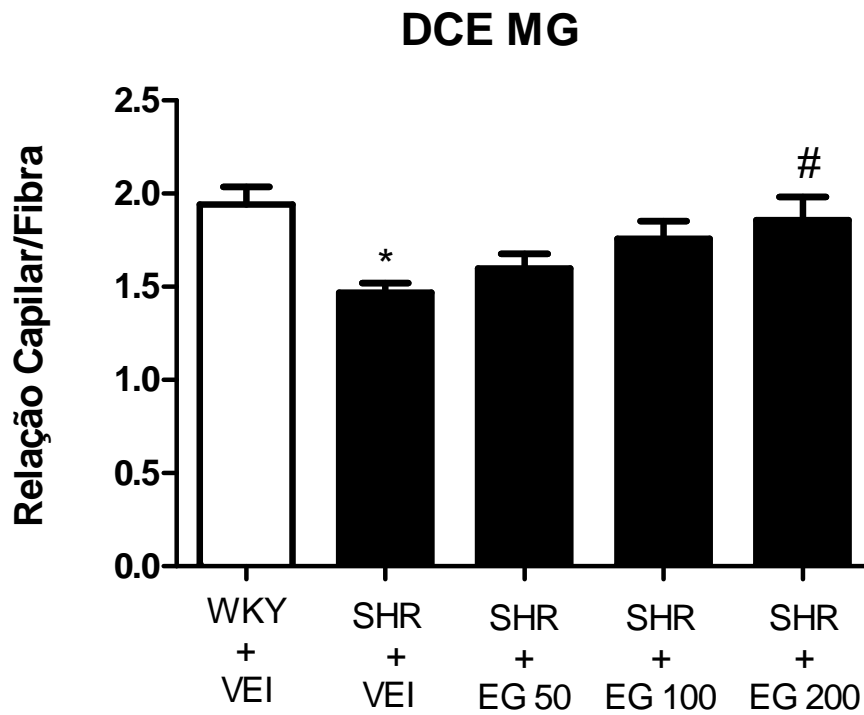


Figura 4.3.2 - Relação capilar/fibra no músculo esquelético de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI) EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média \pm EPM de 10 animais. * $p < 0,05$ vs WKY; # $p < 0,05$ vs SHR.

Quando comparada com o grupo de animais controle normotensos (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, evidenciando a rarefação capilar estrutural característica deste grupo de animais (Tabela 4.3.3, Figura 4.3.2).

O tratamento com diferentes doses de EG não foi capaz de modificar a $Vv[cap]/Vv[fib]$ no ventrículo esquerdo dos animais SHR.

Tabela 4.3.2 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Miocárdio

Grupo	Relação capilar/fibra no músculo cardíaco
WKY + VEI	0,27 ± 0,008
SHR + VEI	0,20 ± 0,01*
SHR + EG 50	0,19 ± 0,01*
SHR + EG 100	0,16 ± 0,01*
SHR + EG 200	0,17 ± 0,01*

Relação capilar/fibra no músculo esquelético de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média ± EPM de 10 animais. * $p < 0,05$ vs WKY

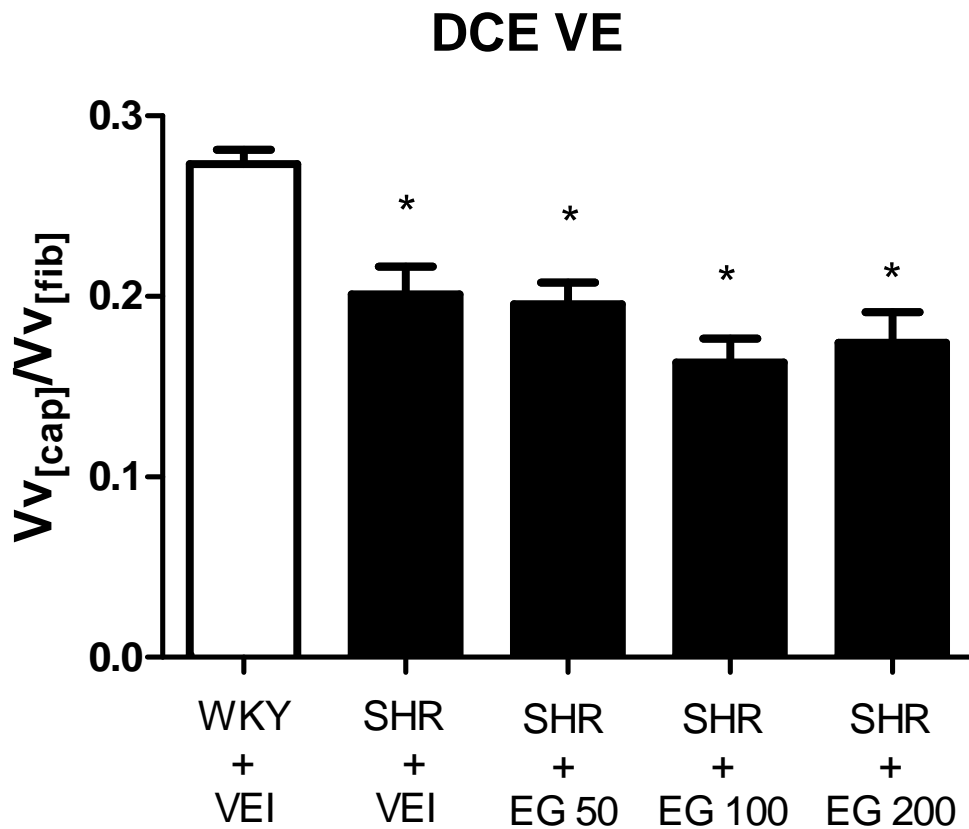


Figura 4.3.3 - Relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras no ventrículo esquerdo de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média \pm EPM de 10 animais. * $p < 0,05$ vs WKY

4.4 - Efeitos do tratamento sobre a hipertrofia do ventrículo esquerdo

A hipertrofia ventricular esquerda é uma complicação precoce da hipertensão arterial. A massa ventricular esquerda é aumentada em cerca de 20% em hipertensos leves e moderados (83). O prognóstico da hipertensão arterial é agravado pela presença da hipertrofia ventricular esquerda. Os hipertensos com hipertrofia ventricular esquerda sobrevivem menos que aqueles com massa ventricular normal. Os doentes com hipertrofia ventricular esquerda tendem a ter maior prevalência de lesões em órgãos-alvo, tais como rins, fundo de olho, coronárias e carótidas (84).

Através do método de Scherle (1970) foi possível avaliar a hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) pelo valor encontrado para a massa do mesmo, sendo representada pela relação VE/massa corporal (mg/g).

Quando comparada com o grupo de animais controle normotensos (WKY + VEI), a relação VE/massa corporal dos animais SHR encontrava-se significativamente aumentada, evidenciando a HVE característica deste grupo de animais (Figura 4.4).

O tratamento crônico com EG não foi capaz de reverter a HVE presente neste modelo de hipertensão.

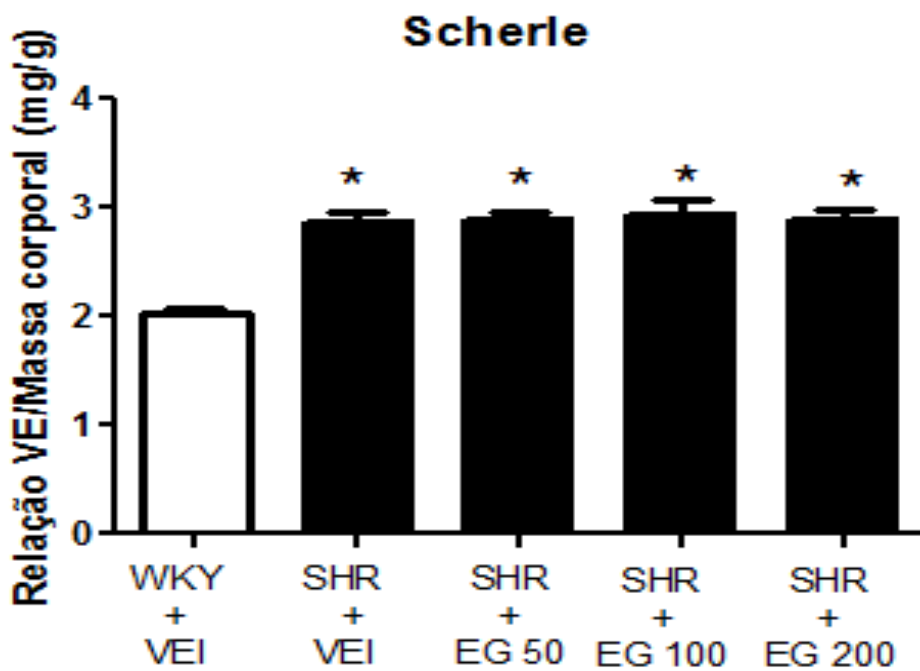


Figura 4.4 - Relação VE/Massa corporal (mg/g) de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), EG (SHR + 50 mg/kg/dia), EG (SHR + 100 mg/kg/dia) ou EG (SHR + 200 mg/kg/dia). Os valores representam a média \pm EPM de 10 animais. * $p < 0,05$ vs WKY

5. Discussão

Neste trabalho foi utilizado o modelo de hipertensão primária SHR, que é reconhecido como um excelente modelo de hipertensão experimental. Em 1963, Okamoto e Aoki introduziram um novo modelo experimental de hipertensão, sem que nenhum recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico fosse necessário (85). Os SHRs foram desenvolvidos por uma reprodução genética meticulosa, entre irmãos e irmãs, que uniformemente resultou em animais naturalmente portadores de doença hipertensiva, em 100% dos descendentes (86).

A semelhança entre a hipertensão humana e a observada no SHR, inclui: a predisposição genética para hipertensão sem etiologia específica, o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume e igual resposta a tratamentos com drogas (87). Embora a hipertensão dos SHR seja de desenvolvimento espontâneo, fatores ambientais tais como, ingestão exagerada de sódio (88), estresse (89), alterações sociais (90), e alterações do ciclo claro/escuro (91) afetam esse desenvolvimento.

A hipertensão do SHR adulto está associada com um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal ou diminuído (92). Um achado consistente nos SHR é o aumento da resistência periférica total (93). Parece que as pequenas artérias, arteríolas e, possivelmente, os esfíncteres pré-capilares sejam os principais responsáveis pelo aumento da resistência vascular periférica (87, 94). Acredita-se que tanto processos ativos como estruturais sejam responsáveis pelo aumento da resistência periférica. Por exemplo, alteração da geometria vascular (94), alterações da membrana celular da musculatura lisa vascular (95) ou diminuição da densidade arteriolar da musculatura esquelética (96).

Foi demonstrado que durante o desenvolvimento da hipertensão (pré-hipertensos e hipertensos em estágio inicial) em SHR, o relaxamento dependente do endotélio é preservado ou possivelmente prejudicado, e essa deficiência não fornece nenhuma contribuição significativa para o aparecimento de hipertensão neste modelo (97). Da mesma forma, na aorta de jovens SHR stroke-prone, o relaxamento dependente do endotélio e a produção de NO em resposta a agonistas colinérgicos foram melhoradas, em comparação com ratos WKY (98), corroborando com a função do NO no início do estado hipertensivo.

Em SHR adultos, Grunfeld e colaboradores (1995) constataram que a produção de NO no coração e vasos sanguíneos não é geralmente afetada e pode até mesmo estar aumentada, mas o aumento da produção de ânion superóxido reduz a sua biodisponibilidade (99). Neste caso o NO não é capaz de estimular quantidade suficiente de cGMP e manter uma adequada vasodilatação dependente de NO (100). Podemos explicar o efeito anti-hipertensivo do extrato de EG demonstrado pelo estudo, onde a pressão dos animais tratados reduziu significativamente quando comparado ao controle SHR, por esta via, uma vez que estudos anteriores mostraram que a ação do EG é via NO-GMPc.

De fato, os mecanismos envolvidos na hipertensão do SHR ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns trabalhos têm demonstrado que a Angiotensina 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 pressão arterial, bem como uma redução da mortalidade (101, 102). 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 (103). Embora a eNOS esteja aumentada, aparentemente ela não está acoplada e ativa, uma vez que ao tratar SHR com BH4, um co-fator da NOS, observa-se uma redução na pressão arterial (104).

Este modelo se mostrou o mais adequado para este estudo, que teve como objetivo estudar os efeitos de diferentes doses do extrato hidro-alcóolico de EG sobre a densidade capilar em um modelo animal de hipertensão primária.

Foi visto que as diferentes doses usadas, do extrato de EG foram capazes de reduzir os níveis pressóricos dos animais hipertensos quando comparados com os grupos controles WKY e SHR que tiveram mantidos seus valores de pressão arterial ao fim do tratamento com veículo (água destilada) ao término das 4 semanas de tratamento.

Conforme trabalho publicado em 2008, onde Lessa e colaboradores demonstraram que o tratamento agudo com o extrato etanólico de *Echinodorus grandiflorus* induziu efeito anti-hipertensivo dose-dependente em ratos SHR anestesiados, sendo esses efeitos relacionados com NO, vias colinérgicas e receptores PAF. Corroborando com resultados de Tibiriçá e colaboradores (2007) que demonstraram que o extrato de EG causa uma potente vasodilatação dependente do endotélio, óxido nítrico e receptores de PAF, em modelo de aorta de

coelho isolada (22). Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o efeito anti-hipertensivo induzido pelo EG está relacionado à redução simultânea de dois parâmetros hemodinâmicos envolvidos na regulação da pressão arterial: o débito cardíaco e a resistência vascular periférica (21).

A atividade de alguns compostos da família Alismataceae, como o Alismol, sesquiterpenoide isolado a partir do rizoma da *Alisma orientale*, inibe a contratilidade e reduz a pressão arterial em diferentes modelos experimentais (18), e reduz a contratilidade via canais de cálcio dependente de voltagem (20).

O endotélio vascular tem um papel essencial na regulação do sistema cardiovascular, principalmente no controle do tônus vasomotor, via síntese e liberação de substâncias vasodilatadoras como o NO e a prostaciclina (37). A via do NO-GMPc tem um papel importante não só no relaxamento na musculatura lisa vascular, mas também na inibição da proliferação dessa musculatura lisa, adesão de plaquetas e leucócitos, na permeabilidade vascular, e na síntese de colágeno da matriz extracelular no sistema vascular (37).

Uma redução na produção do NO pelas células endoteliais vasculares está intimamente associada com a disfunção endotelial, que acredita-se ser um importante fator nas doenças cardiovasculares, especialmente no desenvolvimento da hipertensão (105). O desenvolvimento de drogas vasodilatadoras que agem restaurando a níveis normais o nível de NO-GMPc no sistema vascular poderia ser de grande valia para o tratamento de doenças cardiovasculares (22).

Tibirichá e colaboradores (2007) demonstraram que a vasodilatação induzida pelo extrato aquoso de EG foi dependente da atividade da NOS, pois a sua atividade foi reduzida após a inibição com L-NAME (22). O NO tem papel importante no relaxamento causado pelo EG e este fato foi confirmado quando o uso "in vivo" de um bloqueador da guanilato ciclase (sGC) atenuou a vasodilatação induzida pelo extrato, em anéis de aorta de coelhos (22). É amplamente aceito que a ativação da sGC seja um dos mais importantes efetores do NO, no sistema cardiovascular (37).

Apesar dos resultados encontrados sobre a pressão arterial, não houve alteração na frequência cardíaca dos animais SHR tratados com extrato de EG, corroborando com os dados já demonstrados por nosso laboratório, onde a ausência de bradicardia depois de uma administração sistêmica de EG, não está relacionada com a redução da atividade simpática ou ao bloqueio dos receptores adrenérgicos periféricos, mas acredita-se que esses efeitos sejam mediados pela ativação dos

receptores muscarínicos, e neutralizadas pela ativação do baroreflexo induzido por uma vasodilatação aguda (21). Esses dados já haviam sido demonstrados, onde o extrato de EG induziu uma potente vasodilatação em anéis de aorta de coelhos isolados (22).

Como descrito anteriormente a hipertensão arterial pode ter como causa a rarefação microvascular, contudo faz-se necessário o uso da microscopia intravital, através da técnica de epi-iluminação acoplada à fluorescência, que permite a visualização da rede de capilares em órgãos ou tecidos não translúcidos. Através da contagem dos capilares espontaneamente perfundidos, observados na pele da orelha e na fáscia ventral do músculo esquelético grácil, foi possível a determinação da densidade capilar funcional, sendo esta medida tomada como o conjunto dos capilares teciduais funcionais de um determinado leito vascular.

O tecido muscular esquelético foi investigado em virtude de sua importante participação na determinação da resistência vascular periférica, principal alteração hemodinâmica que mantém a pressão arterial aumentada em pacientes hipertensos. O uso do músculo grácil ocorreu pelo extenso uso do mesmo em diversos trabalhos descritos na literatura (96, 106) a fim de determinar a densidade capilar funcional (DCF) e em função da facilidade de acesso ao mesmo para a visualização sob o microscópio.

Confirmamos que a hipertensão neste modelo animal (SHR) é acompanhada de rarefação capilar funcional, na pele e no músculo esquelético. Essa confirmação foi possível porque constatou-se que os animais SHR controle apresentavam um número significativamente reduzido de capilares em relação aos ratos normotensos Wistar-Kyoto. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que descrevem modificações funcionais na microcirculação destes animais (50, 107).

Os animais tratados com o extrato de EG apresentaram um aumento da DCF muscular e cutânea, que foi dose dependente, e se mostrou significativamente maior que os valores encontrados no grupo de animais hipertensos. Esse resultado é conhecido como um ajuste que supera os valores normais e encontra-se descrito na literatura como resultado da vasodilatação e conseqüente redução da pressão arterial pela terapia anti-hipertensiva que promove a perfusão de vasos antes não perfundidos (61, 63).

O músculo esquelético possui participação importante na determinação da resistência vascular periférica. Além disso, também foi mostrado que a resistência

vascular periférica aumentada é a principal alteração hemodinâmica que mantém a pressão arterial elevada em pacientes hipertensos e que este aumento pode ocorrer, pelo menos em parte em função da rarefação capilar observada nestes pacientes (51, 53). Assim, é fundamental o conhecimento dos efeitos do tratamento com o extrato de EG sobre a DCF na pele, pois estes dados poderiam ser usados para se conhecer a eficácia clínica do tratamento no que se refere aos efeitos sobre a microcirculação.

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 acoplada à fluoresceína.

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 com um marcador visível, como derivados de peroxidase ou com marcadores fluorescentes, como derivados de fluoresceína ou de rodamina. Hansen-Smith e colaboradores mostraram que as células endoteliais de diversas espécies de mamíferos ligam as lectinas GSI e GSI-B4 (108). 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.

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 avaliação do efeito do tratamento com EG sobre a densidade capilar estrutural neste tecido permite a capacidade de reduzir/prevenir a ocorrência de lesões de órgão-alvo e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Demonstramos que os animais hipertensos apresentavam uma menor relação capilar/fibra, tanto no músculo esquelético quanto no ventrículo esquerdo, quando comparados com animais do controle normotenso WKY. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que atribuem modificações estruturais na microcirculação destes animais tanto no músculo esquelético (51, 68, 75, 109) quanto no ventrículo esquerdo (110) e favorecem a hipótese de que a rarefação capilar estrutural seja devido ao aumento do estresse oxidativo, pois promove a apoptose de células endoteliais nos microvasos de SHR (111).

O aumento do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, que antes se encontrava reduzido devido ao fechamento crônico de capilares, estimularia o crescimento de novos vasos através do aumento do estresse de cisalhamento na parede do vaso devido à vasodilatação causada pelo extrato, aumentando a rede de capilares para uma maior perfusão no músculo grácil, tecido adaptado a uma baixa perfusão (112, 113).

Por outro lado, nenhuma das doses de EG utilizadas para o tratamento crônico foi capaz de reverter a rarefação capilar estrutural presente no ventrículo esquerdo dos SHR. Em recente revisão, Levy e colaboradores (2008) explicam que a rarefação capilar encontrada no coração deve ser vista de forma diferente que a apresentada no músculo esquelético, não apenas devido à perda efetiva de vasos, mas a falha no crescimento capilar necessário para corresponder ao aumento da massa miocárdica que normalmente acompanha a hipertensão (114).

A hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) representa freqüente complicação da hipertensão arterial (115). Para estudar os efeitos do tratamento crônico com extrato de EG sobre a HVE em SHR fez-se uso do modelo de determinação volumétrica de órgão descrito por Scherle em 1970, escolhido por ser acurado e mais prático. Este método permite a determinação do volume de determinado órgão através do deslocamento do nível da água que este promove ao ser colocado num recipiente contendo líquido (princípio de Arquimedes).

Em nosso estudo, a HVE presente no modelo de hipertensão SHR foi demonstrada através da comparação com animais do grupo controle normotenso. Foi verificada no SHR, que as alterações estruturais existentes no coração hipertrofiado podiam ser influenciadas pela idade, duração da hipertensão e sua gravidade e duração da hipertrofia e sua extensão (116).

A HVE resulta de diversos estímulos, especialmente biomecânicos e neuro-humorais (117). Os estímulos iniciadores da hipertrofia da célula cardíaca dependem de fatores hemodinâmicos, que determinam estiramento mecânico das fibras miocárdicas, fatores ativadores de receptores alfa-1-adrenérgicos, da angiotensina II, da endotelina, dos receptores hormonais tireoideanos e insulínicos (118). A regressão está devidamente comprovada com os inibidores neuro-adrenérgicos, com a maioria dos bloqueadores beta, com a maioria dos antagonistas do cálcio, e com os inibidores da enzima de conversão da angiotensina (119, 120).

Em nosso estudo a reversão da HVE não foi vista em nenhum dos grupos tratados com EG. Corroborando com o trabalho publicado por Nogueira que escreveu sobre os efeitos dos diuréticos e vasodilatadores arteriais diretos, que não evidenciaram regressão significativa da hipertrofia, quando estes fármacos são administrados isoladamente, fato relacionado, provavelmente, com a estimulação simpática e/ou do sistema renina-angiotensina por eles induzida (116).

Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, os efeitos do EG sobre alterações microvasculares comuns da hipertensão arterial sistêmica. Foi visto que as diferentes doses usadas, do extrato de EG foram capazes de reduzir os níveis pressóricos dos animais hipertensos quando comparados com os grupos controles WKY e SHR que tiveram mantidos seus valores de pressão arterial ao fim do tratamento com veículo (água destilada) ao término das 4 semanas de tratamento. O tratamento crônico de animais SHR com o extrato de *Echinodorus grandiflorus* apresenta efeito anti-hipertensivo com reversão do processo de rarefação capilar funcional e estrutural no músculo grácil e na pele.

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 espontaneamente perfundidos, bem como do número de capilares totais presentes nos tecidos estudados. Estes resultados mostram que a rarefação capilar em SHR ocorre na pele, no músculo esquelético e no miocárdio.

Foi demonstrada que a rarefação da densidade capilar funcional cutânea e muscular esquelética, assim como, a densidade capilar estrutural muscular esquelética podem ser revertidas nesse modelo de hipertensão arterial primária após tratamento crônico com o extrato de *Echinodorus grandiflorus*, na maior dose. Por outro lado, o tratamento não reverteu a rarefação capilar estrutural no ventrículo esquerdo desses animais. Estudos futuros são necessários para verificar os efeitos do extrato na regulação do processo de angiogênese através de suas diferentes vias de ativação.

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que o tratamento com EG, não apenas normaliza a pressão arterial, mas traz benefícios à microcirculação que implicam em uma diminuição nos riscos de desenvolvimento de lesões em órgãos-alvo, tendo em vista a reversão da rarefação capilar presente neste modelo de hipertensão arterial primária.

7. Referências bibliográficas

1. Shu YZ. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J Nat Prod.* 1998 Aug;61(8):1053-71.
2. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod.* 1997 Jan;60(1):52-60.
3. De Smet PA. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs.* 1997 Dec;54(6):801-40.
4. Farnsworth B, Joyeau A, Zaremski P. Developing a treatment plan likely to achieve compliance. *Adv Nurse Pract.* 1997 Apr;5(4):14.
5. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 2003 Jul;66(7):1022-37.
6. Pieters L, Vlietinck AJ. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *J Ethnopharmacol.* 2005 Aug 22;100(1-2):57-60.
7. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.* 2004 Dec;67(12):2141-53.
8. Alonso A, Martinez-Gonzalez MA. Olive oil consumption and reduced incidence of hypertension: the SUN study. *Lipids.* 2004 Dec;39(12):1233-8.
9. Rodriguez-Rodriguez R, Herrera MD, de Sotomayor MA, Ruiz-Gutierrez V. Pomace olive oil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by increasing endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Hypertens.* 2007 Jul;20(7):728-34.
10. Rodriguez-Rodriguez R, Stankevicius E, Herrera MD, Ostergaard L, Andersen MR, Ruiz-Gutierrez V, et al. Oleanolic acid induces relaxation and calcium-independent release of endothelium-derived nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 2008 Oct;155(4):535-46.
11. Martinez-Gonzalez J, Rodriguez-Rodriguez R, Gonzalez-Diez M, Rodriguez C, Herrera MD, Ruiz-Gutierrez V, et al. Oleanolic acid induces prostacyclin release in human vascular smooth muscle cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *J Nutr.* 2008 Mar;138(3):443-8.
12. de Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2004 Jan;90(1):135-43.
13. Côrrea ADB, R.S.; Quintas, L.E.M. Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica. *Vozes.* 1998:246.
14. Pereira FDP, J.E.B.P.; Cardoso, M.G.; Lameira, O.A. . Propagação in vitro de chapéu de couro (*Echinodorus cf. scaber* RATAJ), uma planta medicinal. *Ciênc Agrotec.* 2000;24 (Edição especial):74-80.
15. Martins E.R DMC, D.C Castellani, J.E Dias. Plantas medicinais. Viçosa: UFV. 1995:220.
16. Dutra RCT, C.Z; Ferraz, O.S; Sousa, O.V.; Pimenta DS. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2006;16(4):469-74.

17. Pinto AC, Rego GC, Siqueira AM, Cardoso CC, Reis PA, Marques EA, et al. Immunosuppressive effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 2007 May 4;111(2):435-9.
18. Yamahara JK, G.; Iwamoto, M.; Matsuda, H.; Fujimura, H. The effect of Alismol isolated from *alismatis rhizoma* on experimental hypertensive models in rats. *Phytotherapy res.* 1989;3:57 - 60.
19. Matsuda H, Kobayashi G, Yamahara J, Fujimura H, Kurahashi K, Fujiwara M. Effects of alismol isolated from *Alismatis Rhizoma* on calcium-induced contraction in the rabbit thoracic aorta. *Life Sci.* 1987 Oct 12;41(15):1845-52.
20. Matsuda H, Yamahara J, Kobayashi G, Fujimura H, Kurahashi K, Fujiwara M. Effect of alismol on adrenergic mechanism in isolated rabbit ear artery. *Jpn J Pharmacol.* 1988 Apr;46(4):331-5.
21. Lessa MA, Araujo CV, Kaplan MA, Pimenta D, Figueiredo MR, Tibirica E. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008 Apr;22(2):161-8.
22. Tibirica E, Almeida A, Caillleaux S, Pimenta D, Kaplan MA, Lessa MA, et al. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *J Ethnopharmacol.* 2007 Apr 20;111(1):50-5.
23. RIBEIRO RAB, F; MELO, M.M.R.F; CHIEIA, S; WANDERLEY, M.G; GOMES, C; TROLIN, G. Acute diuretic effects in conscious rats produced by some medicinal plants used in the state of São Paulo, Brasil. *Journal of Ethnopharmacology.* 1988;24:19-29.
24. CARDOSO GLCP, N.A; LAINETTI,R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*). . *Revista Brasileira de Farmácia.* 2003;84(1):5-7.
25. 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.
26. Nefrologia. SBdCSBdHSBd. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(1 supl.1):1-51.
27. Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ.* 2001 Apr 14;322(7291):912-6.
28. Consolim-Colombo FM FP. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica – aspectos clínicos. *Rev Bras de Hipertensão.* 2005(12):251-5.
29. Irigoyen MC FP, De Angelis K, Krieger EM. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. *Rev Bras de Hipertensão.* 2005(12):229-33.
30. Vasconcelos SML GM, Silva MAM, Gomes ACM. Oxidative hypothesis of hypertension: a mini-review. *Rev Bras Hipertens* 2007;14(4):269-74.
31. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov 27;288(5789):373-6.
32. Vapaatalo H, Mervaala E, Nurminen ML. Role of endothelium and nitric oxide in experimental hypertension. *Physiol Res.* 2000;49(1):1-10.
33. Bernatova I, Conde MV, Kopincova J, Gonzalez MC, Puzserova A, Arribas SM. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: focus on methodological aspects. *J Hypertens Suppl.* 2009 Aug;27(6):S27-31.
34. Rossi R, Chiurlia E, Nuzzo A, Cioni E, Origliani G, Modena MG. Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Oct 19;44(8):1636-40.

35. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol*. 2009 Jun;157(4):527-36.
36. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Jun 30;153(3):1251-6.
37. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*. 1989 Jun;13(6 Pt 2):658-67.
38. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des*. 2003;9(29):2385-402.
39. Rizzoni D. Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fantasy? *J Hypertens*. 2002 Aug;20(8):1479-81.
40. Spieker LE, Noll G, Ruschitzka FT, Maier W, Luscher TF. Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. *J Hum Hypertens*. 2000 Oct-Nov;14(10-11):617-30.
41. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Aug;6(8):662-80.
42. Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 1994 Feb;23(2):229-35.
43. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Buralli S, Salvetti A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation*. 1999 Sep 28;100(13):1400-5.
44. Schiffrin EL. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 2):876-81.
45. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Cappello S, Pagliaro P, Westerhof N, et al. Effect of endothelins on the cardiovascular system. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2006 Sep;7(9):645-52.
46. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Sudano I, Notari M, Salvetti A. Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension. *Circulation*. 1999 Oct 19;100(16):1680-3.
47. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*. 1993 Jun;21(6 Pt 2):929-33.
48. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J. Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:2-5.
49. Guyton ACH, J.E. "Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology.". Elsevier Health Medicine ed. 2006.
50. Vicaut E. Hypertension and the microcirculation: a brief overview of experimental studies. *J Hypertens Suppl*. 1992 Jul;10(5):S59-68.
51. 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.
52. Serne EH, de Jongh RT, Eringa EC, RG IJ, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension*. 2007 Jul;50(1):204-11.

53. 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.
54. Antonios TF, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Structural skin capillary rarefaction in essential hypertension. *Hypertension*. 1999 Apr;33(4):998-1001.
55. 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.
56. 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.
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. Antonios TF, Kaski JC, Hasan KM, Brown SJ, Singer DR. Rarefaction of skin capillaries in patients with anginal chest pain and normal coronary arteriograms. *Eur Heart J*. 2001 Jul;22(13):1144-8.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Christensen KL, Mulvany MJ. Vasodilatation, not hypotension, improves resistance vessel design during treatment of essential hypertension: a literature survey. *J Hypertens*. 2001 Jun;19(6):1001-6.
63. 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.
64. 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.
65. Rakusan K, Cicutti N, Kazda S, Turek Z. Effect of nifedipine on coronary capillary geometry in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1994 Aug;24(2):205-11.
66. Miura S, Fujino M, Matsuo Y, Tanigawa H, Saku K. Nifedipine-induced vascular endothelial growth factor secretion from coronary smooth muscle cells promotes endothelial tube formation via the kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1/NO pathway. *Hypertens Res*. 2005 Feb;28(2):147-53.
67. 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.
68. Sabino B, Lessa MA, Nascimento AR, Rodrigues CA, Henriques MG, Garzoni LR, et al. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Apr;51(4):402-9.

69. 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.
70. 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.
71. Vicaut E, Hou X. Local renin-angiotensin system in the microcirculation of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1994 Jul;24(1):70-6.
72. 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.
73. Wang DH, Prewitt RL. Captopril reduces aortic and microvascular growth in hypertensive and normotensive rats. *Hypertension*. 1990 Jan;15(1):68-77.
74. Nelissen-Vrancken HJ, Boudier HA, Daemen MJ, Smits JF. Antihypertensive therapy and adaptive mechanisms in peripheral ischemia. *Hypertension*. 1993 Nov;22(5):780-8.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie*. 1970 Jun;26(1):57-60.
80. 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.
81. 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.
82. Skyschally A, Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization. *Circ J*. 2003 Apr;67(4):279-86.
83. GALVÃO DE LIMA J. Reversão da hipertrofia ventricular esquerda na terapêutica da hipertensão arterial: fato ou ficção? *HiperAtivo*. 1998;5(2):202-5.
84. Waeber B WR, Brunner HR. . Physiopathologie de l'hypertrophie ventriculaire gauche. *Arch Mal Coeur* 1995;88:9-14.
85. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.
86. Okamoto K, Tabei R, Fukushima M, Nosaka S, Yamori Y. Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1966 Jun;30(6):703-16.
87. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*. 1981 Mar;48(3):309-19.

88. Louis WJ, Tabei R, Spector S. Effects of sodium intake on inherited hypertension in the rat. *Lancet*. 1971 Dec 11;2(7737):1283-6.
89. Yamori Y, Matsumoto M, Yamabe H, Okamoto K. Augmentation of spontaneous hypertension by chronic stress in rats. *Jpn Circ J*. 1969 Apr;33(4):399-409.
90. Hallback M, Isaksson O, Noresson E. Consequences of myocardial structural adaptation on left ventricular compliance and the Frank-Starling relationship in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*. 1975 Jun;94(2):259-70.
91. Lais LT, Shaffer RA, Brody MJ. Neurogenic and humoral factors controlling vascular resistance in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*. 1974 Nov;35(5):764-74.
92. Potts JT, McKeown KP, Shoukas AA. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. *Am J Physiol*. 1998 Apr;274(4 Pt 2):H1121-31.
93. Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR, Jr., Murphy WR, Hockel GM. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res*. 1976 Jun;38(6 Suppl 2):21-9.
94. Folkow B. Early structural changes in hypertension: pathophysiology and clinical consequences. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 1:S1-6.
95. Overbeck HW, Johnston RF. Experimental variation in vascular response studies. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972 Dec;141(3):1041-3.
96. Prewitt RL, Chen, II, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1982 Aug;243(2):H243-51.
97. Torok J, Koprdoва R, Cebova M, Kunes J, Kristek F. Functional and structural pattern of arterial responses in hereditary hypertriglyceridemic and spontaneously hypertensive rats in early stage of experimental hypertension. *Physiol Res*. 2006;55 Suppl 1:S65-71.
98. Onda T, Mashiko S, Hamano M, Tomita I, Tomita T. Enhancement of endothelium-dependent relaxation in the aorta from stroke-prone spontaneously hypertensive rats at developmental stages of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1994 Nov;21(11):857-63.
99. Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, et al. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 1995 Dec;26(6 Pt 1):854-7.
100. Nava E, Farre AL, Moreno C, Casado S, Moreau P, Cosentino F, et al. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 1998 May;16(5):609-15.
101. Hu WY, Chen DG, Chen SC, Jin XQ, Wang HJ. Effect of chronic captopril treatment on circulating and tissue renin-angiotensin system in SHR rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1996 Nov;17(6):507-12.
102. Zhang L, Edwards DG, Berecek KH. Effects of early captopril treatment and its removal on plasma angiotensin converting enzyme (ACE) activity and arginine vasopressin in hypertensive rats (SHR) and normotensive rats (WKY). *Clin Exp Hypertens*. 1996 Feb;18(2):201-26.
103. 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.
104. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res*. 2006 Jul 15;71(2):247-58.
105. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res*. 1996 May-Jun;33(3):181-94.

106. 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.
107. Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Levy BI. Hypertension: a disease of the microcirculation? *Hypertension*. 2006 Dec;48(6):1012-7.
108. 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.
109. Nascimento AR, Lessa MA, Sabino B, Bousquet P, Tibirica E. Microvascular effects of centrally acting antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 Mar;55(3):240-7.
110. 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.
111. 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.
112. Fulgenzi G, Graciotti L, Collis MG, Hudlicka O. The effect of alpha 1 adrenoceptor antagonist prazosin on capillary supply, blood flow and performance in a rat model of chronic muscle ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1998 Jul;16(1):71-7.
113. Zhou A, Egginton S, Hudlicka O, Brown MD. Internal division of capillaries in rat skeletal muscle in response to chronic vasodilator treatment with alpha1-antagonist prazosin. *Cell Tissue Res*. 1998 Aug;293(2):293-303.
114. Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, Agostini D, Vicaud E, Safar ME, et al. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation*. 2008 Aug 26;118(9):968-76.
115. 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.
116. Nogueira JB. Left ventricular hypertrophy in systemic hypertension. Benefits of its reversal. *Arq Bras Cardiol*. 1999 Jul;73(1):103-12.
117. Gradman AH, Alfayoumi F. From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2006 Mar-Apr;48(5):326-41.
118. Benjamin EJ, Levy D. Why is left ventricular hypertrophy so predictive of morbidity and mortality? *Am J Med Sci*. 1999 Mar;317(3):168-75.
119. Dahlof B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens*. 1992 Feb;5(2):95-110.
120. Schmieder RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized double-blind studies. *JAMA*. 1996 May 15;275(19):1507-13.