



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ**  
**Faculdade de Ciências Médicas - FCM**  
**Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental -**  
**FISCLINEX**

**Alessandro Rodrigues do Nascimento**

*Efeitos do Tratamento Crônico com Anti-hipertensivos de  
Ação Central Sobre a Microcirculação de Ratos Espontaneamente  
Hipertensos*

**Rio de Janeiro**

**2009**

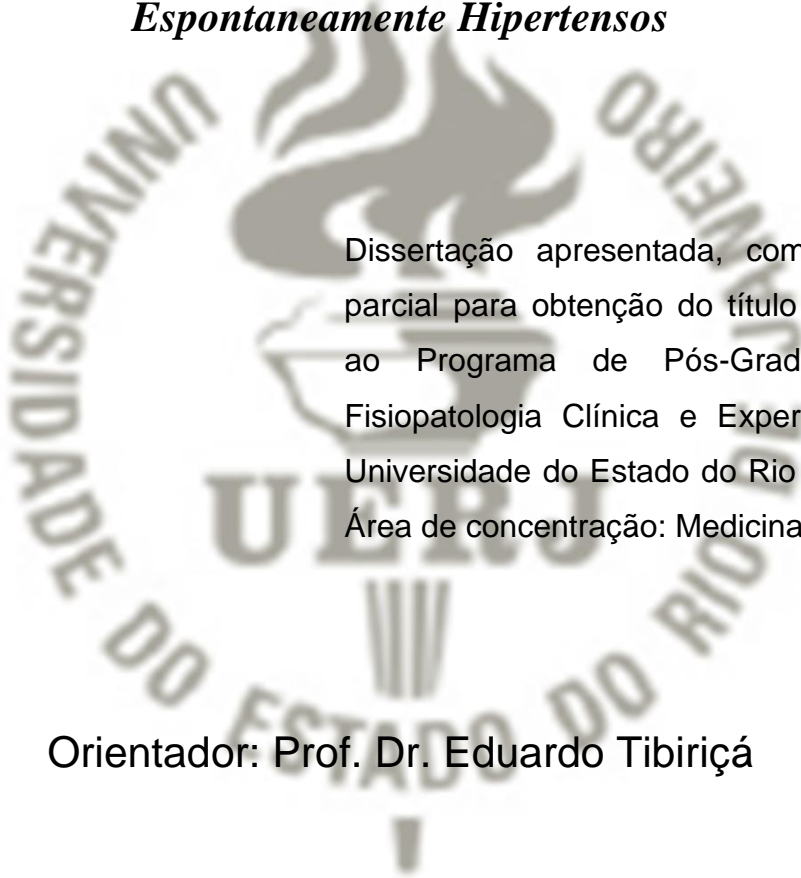
# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Alessandro Rodrigues do Nascimento**

***Efeitos do Tratamento Crônico com Anti-hipertensivos de  
Ação Central Sobre a Microcirculação de Ratos  
Espontaneamente Hipertensos***



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Medicina 1

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Tibiriçá

**Rio de Janeiro**

**2009**

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N244 Nascimento, Alessandro Rodrigues do.

Efeitos do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre a microcirculação de ratos espontaneamente hipertensos / Alessandro Rodrigues do Nascimento - 2009. v, 101f. : il.

Orientador : Eduardo Tibiriçá.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.  
Bibliografia: f. 56-63.

1. Capilares - Densidade - Tratamento - Teses. 2. Hipertensão - Modelos animais - Teses. 3. Microcirculação - Teses. 4. Clonidina - Teses. 5. Coração - Ventrículo esquerdo - Hipertrofia - Teses. I. Tibiriçá, Eduardo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.16

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

Data

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Sandra Nascimento, que sempre estiveram ao meu lado e possibilitaram com seu amor e carinho, que este fosse desenvolvido com calma e dedicação.

## ***Agradecimentos:***

À Deus, por dar-me capacidade de adquirir conhecimento, e por iluminar meus caminhos por 24 anos.

Ao Dr. Eduardo Tibiriçá, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe no Laboratório de Investigação Cardiovascular, e pela competência com que orientou esta dissertação e o tempo que generosamente me dedicou transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, lucidez e confiança. Pelo acesso que me facilitou a uma pesquisa mais alargada e enriquecedora e pela sua crítica sempre tão atempada, como construtiva, bem-haja estou-lhe muito, muito grato.

Ao Dr. Bruno Sabino, pela confiança em meu trabalho que possibilitou meu ingresso na FIOCRUZ para trabalhar ao seu lado em sua tese de Doutorado.

A todos os integrantes do Laboratório de Investigação Cardiovascular da FIOCRUZ, Cláudia Valéria, Isabela Bonomo, Fernanda Cruz, Marcos Adriano e demais.

Ao Rodrigo Cavalheiro e a Fabiana Gomes, pelo apoio técnico e pela amizade.

A Dra. Iolanda Fierro, pela prévia revisão e dicas de formatação.

Aos meus familiares, pelo companheirismo e apoio.

Aos amigos Vanessa Mattos, Paula Andrade, Vanessa Mafra, Rafael Bastos, Éder Carvalhido, Bruno Figueira e Cristiano Horst pela amizade, compreensão e incentivo ao longo desses anos.

Saber é compreendermos  
as coisas que mais nos  
convém.

*Nietzsche*

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMO</b> .....   | 3  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 4  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....  | 5  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 6  |
| 1.1.    Epidemiologia da Hipertensão Arterial.....                                  | 6  |
| 1.2.    Fisiopatologia da Hipertensão Arterial .....                                | 7  |
| 1.2.1. <i>Hipertrofia do Músculo Liso Vascular na Hipertensão Arterial</i> .....    | 8  |
| 1.2.2. <i>Hiperatividade e o Aumento do Tônus Arteriolar</i> .....                  | 8  |
| 1.3.    Microcirculação.....  | 9  |
| 1.3.1. <i>Rarefação Capilar na Hipertensão Arterial</i> .....                       | 10 |
| 1.3.2. <i>Tratamento Anti-hipertensivo e as Alterações Microcirculatórias</i> ..... | 11 |
| 1.4.    Controle Central da Pressão Arterial.....                                   | 12 |
| 1.4.1. <i>Barorreflexo</i> .....  | 13 |
| 1.4.2. <i>Quimiorreflexo</i> .....  | 15 |
| 1.5.    Drogas Anti-hipertensivas de Ação Central.....                              | 15 |
| 1.5.1. <i>Clonidina</i> .....   | 16 |
| 1.5.2. <i>Drogas Anti-hipertensivas de Ação Central de Segunda Geração</i> .....    | 17 |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | 20 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 21 |
| 3.1.    Modelos Animais.....  | 21 |
| 3.2.    Medidas Hemodinâmicas.....  | 21 |
| 3.3.    Microscopia Intravital por Fluorescência .....                              | 22 |
| 3.4.    Avaliação da Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo.....                        | 23 |



|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.5.      | Análise Histológica .....  | 23        |
| 3.6.      | Análise Estatística .....  | 27        |
| 3.7.      | Drogas.....  | 28        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>29</b> |
| 4.1.      | Efeitos dos tratamentos na pressão arterial e na frequência cardíaca   | 29        |
| 4.2 .     | Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Funcional do Músculo Esquelético e da Pele.....                   | 33        |
| 4.3.      | Correlação entre a Densidade Capilar Funcional no Músculo e na Pele .  | 37        |
| 4.4 .     | Efeitos dos Tratamentos na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Esquelético e do Ventrículo Esquerdo..... | 38        |
| 4.5 -     | Efeitos dos Tratamentos sobre a hipertrofia do Ventrículo Esquerdo .....                                     | 43        |
| <b>5.</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | <b>46</b> |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | <b>55</b> |
| <b>7.</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>56</b> |
| <b>8.</b> | <b>ANEXOS</b> .....  | <b>64</b> |
| 8.1.      | Artigo (1).....  | 64        |
| 8.2.      | Artigo (2).....  | 65        |

## **RESUMO**

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) caracteriza-se pelo aumento crônico da resistência vascular periférica, determinado essencialmente na microcirculação, que resulta de alterações vasculares funcionais e estruturais. Além disso, a redução da densidade arteriolar e capilar (rarefação da microcirculação) contribui para a elevação da pressão arterial na HAS. Nesse contexto, sabe-se que a hiperatividade do sistema nervoso simpático central está envolvida na fisiopatologia das alterações tanto funcionais quanto estruturais da HAS. No presente trabalho, investigamos os efeitos do tratamento crônico (28 dias) com anti-hipertensivos de ação central sobre a rarefação capilar funcional e/ou estrutural na pele, músculo esquelético e miocárdio de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) adultos, modelo clássico de hipertensão arterial primária. Os ratos Wistar Kyoto (WKY) foram utilizados como controles normotensos. Foram utilizadas doses equipotentes de clonidina (0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (1 mg/kg/dia) e moxonidina (10 mg/kg/dia), com relação ao efeito anti-hipertensivo. Também foram estudados os efeitos dos tratamentos sobre a massa ventricular esquerda. Para avaliação da densidade capilar funcional utilizamos microscopia por epi-iluminação e fluorescência e para avaliação da densidade capilar estrutural técnicas de marcação histoquímica dos capilares. Os resultados mostraram que houve aumento do número de capilares espontaneamente perfundidos (densidade funcional) na pele e no músculo esquelético de SHR tratados com todos os fármacos, com relação ao grupo SHR não tratado. Além disso, foi observada reversão da rarefação capilar estrutural no músculo esquelético de SHR com todas as drogas utilizadas. Por outro lado, não houve reversão da rarefação capilar estrutural no ventrículo esquerdo em nenhum grupo experimental. Finalmente, a hipertrofia do ventrículo esquerdo foi parcialmente revertida em SHR tratados com rilmenidina. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que, além da redução da pressão arterial, a utilização de agentes anti-hipertensivos de ação central resulta na reversão de alterações microcirculatórias de ratos espontaneamente hipertensos e o uso de rilmenidina favorece a regressão da hipertrofia cardíaca. Os resultados também sugerem que a inibição da hiperatividade simpática central induz efeitos benéficos na microcirculação na hipertensão arterial.

## **ABSTRACT**

Essential hypertension (EH) is characterized by chronic increases in peripheral vascular resistance, mainly resulting from functional and structural alterations of the microcirculation. Moreover, a reduction of arteriolar and capillary density (microvascular rarefaction) is involved in the increase of arterial pressure in EH. In addition, central sympathetic overactivity is involved in the pathophysiology of functional and structural alterations of the cardiovascular system in EH. In the present work, we investigated the effects of a long-term treatment (28 days) with centrally-acting antihypertensive drugs on functional and/or structural capillary rarefaction in the skin, skeletal muscle and heart of adult spontaneously hypertensive rats (SHR), a classical experimental model of EH. We also investigated the effects of the treatments on left ventricular mass in SHR. Wistar Kyoto rats were used as normotensive controls. We used equipotent antihypertensive doses of clonidine (0.1 mg/kg/day), rilmenidine (1 mg/kg/day) and moxonidine (10 mg/kg/day). Functional capillary density was evaluated using epi-illuminated fluorescence video-microscopy while structural capillary density was studied using a histochemical tracer of capillaries. Our results showed that there was an increase in the number of spontaneously perfused capillaries (functional density) in the skin and skeletal muscle of SHR in all treatment groups, when compared to the non-treated SHR group. Moreover, there was a reversion of structural capillary rarefaction in the skeletal muscle with all drug treatments. On the other hand, there was no reversion of structural capillary rarefaction of the left ventricle in any experimental group. Finally, left ventricular hypertrophy was partially reversed in the group of SHR treated with rilmenidine. In conclusion, our results showed that besides arterial pressure reduction, long-term treatment with centrally-acting antihypertensive drugs induces a reversal of microcirculatory alterations in SHR and rilmenidine favors the regression of left ventricular hypertrophy. The results also suggest that the modulation of central sympathetic overactivity induces beneficial effects on the microcirculation in the hypertensive disease.

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

|        |   |
|--------|---|
| CVLM   | <i>Caudal Ventrolateral Medulla</i> - Região Ventrolateral Caudal do Bulbo Raquidiano   |
| DCE    | Densidade Capilar Estrutural  |
| DCF    | Densidade Capilar Funcional   |
| E.P.M. | Erro Padrão da Média  |
| FC     | Frequência Cardíaca   |
| HAS    | Hipertensão Arterial Sistêmica  |
| iECA   | Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina   |
| NTS    | Núcleo do Trato Solitário   |
| PAS    | Pressão Arterial Sistólica  |
| RVLM   | <i>Rostral Ventrolateral Medulla</i> - Região Ventrolateral Rostral do Bulbo Raquidiano |
| SHR    | <i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> - Ratos Espontaneamente Hipertensos              |
| SNS    | Sistema Nervoso Simpático   |
| SRAA   | Sistema Renina-Angotensina-Aldosterona  |

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Epidemiologia da Hipertensão Arterial**

Um terço das mortes no mundo tem como principal causa as doenças cardiovasculares. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, as doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte, atingindo 31,4% da população (SUS 2005). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) constitui atualmente um dos fatores de risco e causa etiológica principal no desenvolvimento de doenças cerebrovasculares, tais como a cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca e renal (Whitworth 2003).

Sem sintomas no seu estágio inicial, a hipertensão é geralmente diagnosticada quando aparecem as complicações do seu longo período sem tratamento, causando grandes perdas em qualidade de vida e aumento da taxa de mortalidade. A grande incidência de mortes prematuras ocasionadas pela HAS decorre de complicações secundárias à doença como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, insuficiência renal e acidente vascular cerebral (Muxfeldt et al. 2004).

Entre os fatores de risco para mortalidade, a hipertensão arterial é responsável por 40% das mortes por acidente vascular cerebral e 25% daquelas por doença coronariana (Chobanian et al. 2003). A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial, a partir de 115/75 mmHg (Lewington et al. 2002).

A hipertensão arterial é considerada um fator determinante de inúmeras alterações anatômicas e funcionais expressivas no organismo humano, cursando com alterações hemodinâmicas, metabólicas e tróficas (Whitworth 2003). Sua alta prevalência, estimada em torno de 26% da população acima dos 18 anos de idade, define um contingente de hipertensos, em nosso país, próximo de 16 milhões de pessoas (SUS 2005).

## 1.2. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial

A HAS é definida como a elevação crônica da pressão arterial. Em vista do aumento significativo do risco associado à pressão arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg e à pressão arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg, ou ambas, consideram-se esses valores o limiar para o diagnóstico, ainda que seja reconhecido que o risco é menor com valores de pressão inferiores. Logo, atualmente já são classificados como níveis de pressão arterial ótima aqueles onde a pressão arterial sistólica é  $< 120$  mmHg e a pressão arterial diastólica é  $< 80$  mmHg (Hipertensão 2006).

A resistência ao fluxo sanguíneo se dá principalmente em pequenas artérias e arteríolas da microcirculação, sendo totalmente dependente do calibre médio desses vasos distribuídos por todos os órgãos e superfície corporal. O diâmetro luminal vascular, por sua vez, é determinado pela espessura da parede arteriolar, assim como por influências neurais e humorais que podem dilatar ou contrair esses vasos (Silvestre & Levy 2000). Dentre os agentes vasoconstritores encontram-se a angiotensina II, catecolaminas, tromboxanos, leucotrienos e a endotelina. Os vasodilatadores incluem as cininas, prostaglandinas e o óxido nítrico. Alguns metabólitos (ácido láctico, íons de hidrogênio e adenosina) e hipóxia também causam vasodilatação. Uma importante propriedade intrínseca dos vasos de resistência é a autorregulação, que se caracteriza por um mecanismo adaptativo no qual o aumento do fluxo sanguíneo nesses vasos resulta em vasoconstrição, protegendo assim a hiper-perfusão dos órgãos (Korner 2007).

Em indivíduos hipertensos, três alterações são frequentemente observadas no leito microvascular: aumento do tônus arteriolar, hipertrofia do músculo liso vascular e rarefação capilar. Essas alterações podem estar presentes em diferentes graus e em todas as formas de hipertensão, suas influências podem variar de acordo com os órgãos envolvidos e o estágio da doença hipertensiva (Silvestre & Levy 2000). Em geral, os eventos mórbidos que agravam a doença cardiovascular resultam de alterações crônicas tanto no coração quanto nos vasos. Por muitos anos, foi dada ênfase às alterações funcionais cardiovasculares, no que se tratava de função cardíaca, atribuía-se às modificações na contratilidade miocárdica, e quanto à vasculatura, atribuía-se ao tônus arterial. No entanto, atualmente, tem sido descrito que seriam as modificações estruturais crônicas que iriam apresentar

importantes consequências funcionais (Korner 2007).

### **1.2.1. Hipertrofia do Músculo Liso Vascular na Hipertensão Arterial**

O remodelamento vascular consiste da hipertrofia da célula muscular lisa das artérias e um aumento do conteúdo da matriz, isto é, um aumento do colágeno extracelular sem qualquer redução na elastina. O aumento da razão entre a espessura da parede interna e o diâmetro do lúmen vascular de pequenas artérias e arteríolas é uma característica bastante comum em indivíduos hipertensos (Levy et al. 1988). Estas alterações estruturais e funcionais são responsáveis por uma redução no diâmetro do lúmen e, assim, um aumento permanente da resistência periférica, com conseqüente aumento de pressão arterial. No endotélio, as alterações na estrutura da parede arterial podem aumentar a força de cisalhamento do sangue e produzir lesões promovendo, assim, disfunções das células endoteliais (Mulvany 1993). A angiotensina II, III e a noradrenalina contribuem para a hipertrofia do músculo liso vascular, por outro lado o óxido nítrico, além da sua função vasodilatadora, parece ter uma potente ação inibitória no processo de remodelamento vascular (Pollman et al. 1998).

### **1.2.2. Hiperatividade e o Aumento do Tônus Arteriolar**

A hiperatividade do sistema nervoso simpático é um importante fator na etiologia da hipertensão arterial. O aumento do tônus arteriolar está associado com a hiperatividade simpática que é observada em cerca de 30% dos indivíduos hipertensos (Esler 2000). Segundo Schmid-Schonbein (1987), uma diminuição de apenas 13% do diâmetro arteriolar é suficiente para produzir um aumento da pressão arterial sistêmica em torno de 50 mmHg em ratos (Schmid-Schonbein et al. 1987) e, como a resistência vascular é inversamente proporcional à quarta potência do raio do vaso, uma pequena variação na luz vascular produz grandes alterações na resistência ao fluxo sanguíneo (Guyton 2005).

A hiperatividade simpática normalmente é acompanhada da diminuição da atividade sistêmica do parassimpático. Esta disfunção autonômica está associada a alterações em diferentes órgãos e sistemas. O aumento do tônus simpático também está envolvido na gênese de diversos fatores de risco cardiovascular, como dislipidemia, resistência à insulina, obesidade, aumento do hematócrito e intolerância

à glicose (Pyorala et al. 1985; Smith et al. 1994).

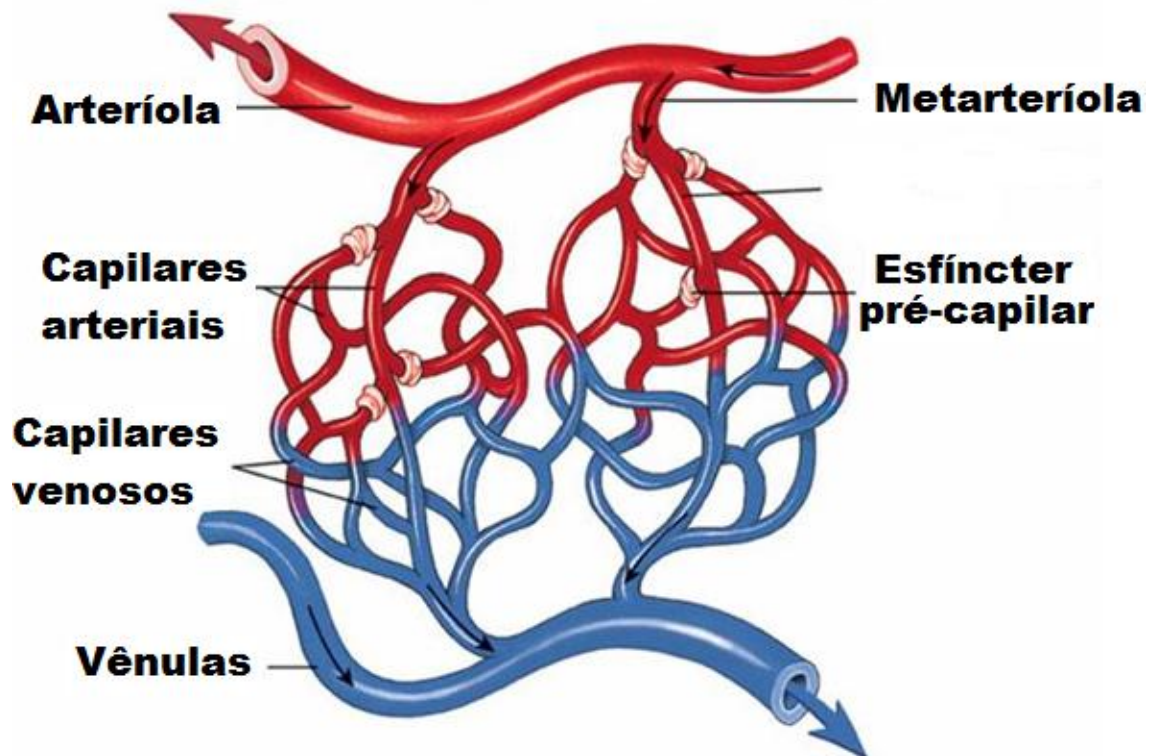
O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e a atividade simpática estão intimamente relacionados, visto que a ativação dos receptores  $\beta$  adrenérgicos renais estimula a liberação de renina que, por sua vez, aumenta os níveis de angiotensina circulantes, um potente vasoconstritor que irá contribuir com o aumento do tônus vascular e hipertrofia ventricular esquerda (Guyton 2005).

### **1.3. Microcirculação**

A microcirculação (Figura 1.1) é responsável pelo transporte de nutrientes e oxigênio para os tecidos e pela remoção dos produtos do metabolismo celular. As pequenas arteríolas controlam o fluxo sanguíneo para cada área de tecido e, por sua vez, as condições locais dos tecidos controlam o diâmetro das arteríolas. Em geral, cada artéria nutridora que entra em um órgão ramifica-se por seis a oito vezes antes que as artérias se tornem suficientemente pequenas para serem chamadas de arteríolas, as quais geralmente têm diâmetros internos menores que 20  $\mu\text{m}$ . Então as arteríolas ramificam-se por duas a cinco vezes, alcançando diâmetros de 5 a 9  $\mu\text{m}$  em suas extremidades, onde suprem sangue aos capilares (Guyton 2005).

Os capilares possuem diâmetros que variam entre 2 e 9  $\mu\text{m}$ , no entanto já foi demonstrado que 50% dos capilares possuem diâmetros inferiores a 4,5  $\mu\text{m}$ . Apresentam uma única camada de células endoteliais sobre uma membrana basal. 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. O leito capilar é responsável pela nutrição aos tecidos, pois é na fina parede capilar que ocorre a troca de fluidos, eletrólitos e oxigênio. A eficácia desta distribuição depende tanto da anatomia do leito capilar quanto da regulação arteriolar sobre o débito dos capilares (Guyton 2005).





**Figura 1.1:** Representação esquemática da ramificação microvascular (adaptado de Guyton 2005).

### 1.3.1. Rarefação Capilar na Hipertensão Arterial

Alterações microvasculares na resistência de vasos em aproximadamente todos os órgãos e, em particular no músculo esquelético, podem contribuir consideravelmente para o aumento da resistência vascular periférica (Bohlen 1986). Duas hipóteses têm sido propostas para explicar esse aumento na resistência vascular. A primeira é a vasoconstrição causada pelo aumento da atividade do nervo simpático (Iriuchijima et al. 1975; Judy et al. 1976) ou aumento da sensibilidade a agentes vasoativos (Bohlen 1986). A segunda é que o aumento crônico da pressão sanguínea causaria o remodelamento da estrutura do músculo liso vascular diminuindo a luz do vaso e o raio interno das arteríolas (Folkow 1982).

Estudos experimentais (Prewitt et al. 1982) e em pacientes (Antonios et al. 1999a), sugerem que a rarefação microvascular contribui para o aumento da resistência vascular sistêmica e poderia ser um fator causal do desenvolvimento da hipertensão arterial. Estudos na microcirculação da conjuntiva e do leito ungueal de pacientes hipertensos demonstraram a presença de rarefação arteriolar e capilar

tanto nos pacientes com a hipertensão já instalada, quanto em pacientes com hipertensão limítrofe (Harper et al. 1978; Gasser & Buhler 1992). Este fenômeno também é encontrado na microcirculação da retina (Harper et al. 1978), no músculo esquelético e no miocárdio de pacientes hipertensos. A rarefação capilar moderada já foi observada em adultos jovens com predisposição familiar à hipertensão arterial (Noon et al. 1997).

Diversos estudos mostraram a rarefação estrutural microvascular em diferentes modelos experimentais e tecidos na hipertensão, incluindo o músculo esquelético (Prewitt et al. 1982; Boegehold et al. 1991; Scheidegger et al. 1996) e a pele (Haack et al. 1980). O rato espontaneamente hipertenso (SHR) é uma linhagem inata que desenvolve aumento da pressão arterial com o aumento da idade e é amplamente usado como modelo experimental de HAS. Ie Noble e colaboradores encontraram rarefação estrutural de capilares e pequenas arteríolas no músculo cremaster de SHR de 5-6 semanas antes de uma elevação substancial na pressão arterial (Ie Noble et al. 1990). Também foi observado um aumento na razão parede-luz em pequenas artérias de resistência do mesentério em SHR em estágio pré-hipertenso (4 semanas) (Rizzoni et al. 1994). Essa rarefação capilar pode ocorrer através do fechamento reversível dos vasos (rarefação funcional) ou através da perda permanente de vasos da rede (rarefação anatômica ou estrutural).

### **1.3.2. Tratamento Anti-hipertensivo e as Alterações Microcirculatórias**

Os efeitos microcirculatórios das drogas anti-hipertensivas poderiam ter papel relevante na prevenção de lesões de órgãos-alvo nos pacientes hipertensos. Neste sentido, existem evidências experimentais consistentes indicando que as diferentes classes de anti-hipertensivos utilizados com maior frequência induzem efeitos diferenciados na rarefação microvascular assim como no aumento da relação parede/luz do vaso (para revisão ver Levy et al., 2001).

Em modelos animais, os efeitos microcirculatórios dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) são os mais estudados e também os mais controversos, já que a angiotensina II induz angiogênese e, em consequência, a inibição de sua síntese deveria resultar em rarefação vascular. No entanto, alguns estudos experimentais demonstraram que os iECA aumentam a densidade capilar no miocárdio de SHR (Gohlke et al. 1997; Bock 1998). Esses efeitos microcirculatórios dos iECA parecem ser independentes tanto da atividade anti-

hipertensiva quanto da inibição do SRAA (Chillon & Baumbach 1999). A inibição da degradação de bradicinina, mais do que os efeitos mediados por angiotensina II, pode ser responsável pelos efeitos pró-angiogênicos dos inibidores da enzima conversora de angiotensina iECA (Antonios et al. 1999). A deficiência do receptor de bradicinina B2 inibe o aumento da vascularização induzida por iECA em patas isquêmicas de camundongos (Silvestre et al. 2001). Existem evidências experimentais mostrando também efeitos pró-angiogênicos de outras classes de agentes anti-hipertensivos, tais como: antagonistas dos receptores AT1 de angiotensina II,  $\beta$ -bloqueadores e bloqueadores dos canais de cálcio (Levy et al. 2001).

Um reduzido número de estudos clínicos investigou os efeitos microvasculares do tratamento anti-hipertensivo. Dois estudos independentes compararam os efeitos do tratamento com iECA com os efeitos induzidos pelos  $\beta$ -bloqueadores, na estrutura de artérias de pequeno calibre de pacientes hipertensos (Schiffrin et al. 1994; Thybo et al. 1995). Os dois estudos mostraram que os iECA, mas não os  $\beta$ -bloqueadores, normalizam a estrutura vascular após um ano de tratamento.

De acordo com Debbabi e colaboradores (2006) estudos realizados em pacientes hipertensos indicam que a rarefação capilar cutânea pode ser revertida em presença de tratamento farmacológico anti-hipertensivo, independente da classe farmacológica utilizada. Olsen e colaboradores (2005) descreveram a redução da hipertrofia vascular e da rarefação capilar, após três anos de tratamento, em 70 pacientes hipertensos tratados com losartan (antagonista dos receptores da angiotensina) quando comparados com atenolol ( $\beta$ -bloqueador) (Olsen et al. 2005).

No entanto, os efeitos do tratamento anti-hipertensivo através de agentes moduladores da atividade simpática central em parâmetros microcirculatórios - tais como a densidade capilar funcional e estrutural - na hipertensão arterial primária humana ainda não são conhecidos.

#### **1.4. Controle Central da Pressão Arterial**

Para o desenvolvimento de estratégias de tratamento das doenças cardiovasculares e da hipertensão arterial primária, a compreensão dos mecanismos de regulação do sistema cardiovascular é de extrema relevância. Neste contexto, se

faz necessário o conhecimento dos mecanismos envolvidos na regulação da atividade simpática e das funções cardiovasculares.

Em mamíferos adultos normais, a pressão arterial raramente varia mais do que 10 a 15% do seu estado basal em repouso. Para a manutenção da constância da pressão arterial, o organismo possui diversos sistemas especializados que atuam em conjunto no controle da pressão arterial. Essa regulação é mediada por mecanismos neurais, quando alterações funcionais rápidas são necessárias, e por agentes humorais, quando a regulação não requer urgência. A regulação neural baseia-se na presença de mecanorreceptores, os barorreceptores e quimiorreceptores, que respondem prontamente a variações da pressão arterial e a demandas metabólicas, através de alterações na atividade vasomotora dos centros bulbares (Zhang et al. 2005).

#### **1.4.1. Barorreflexo**

No mecanismo do barorreflexo, a ativação dos barorreceptores (no seio carotídeo e no arco aórtico) se dá pela distensão das paredes da aorta e das carótidas, que acontece a cada sístole cardíaca, modulando o sistema nervoso autônomo através da geração de sinais neurais. Esses sinais são potenciais de ação conduzidos ao sistema nervoso central, especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS) via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e vago (fibras aórticas). Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando o aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca (Guyton 2005).

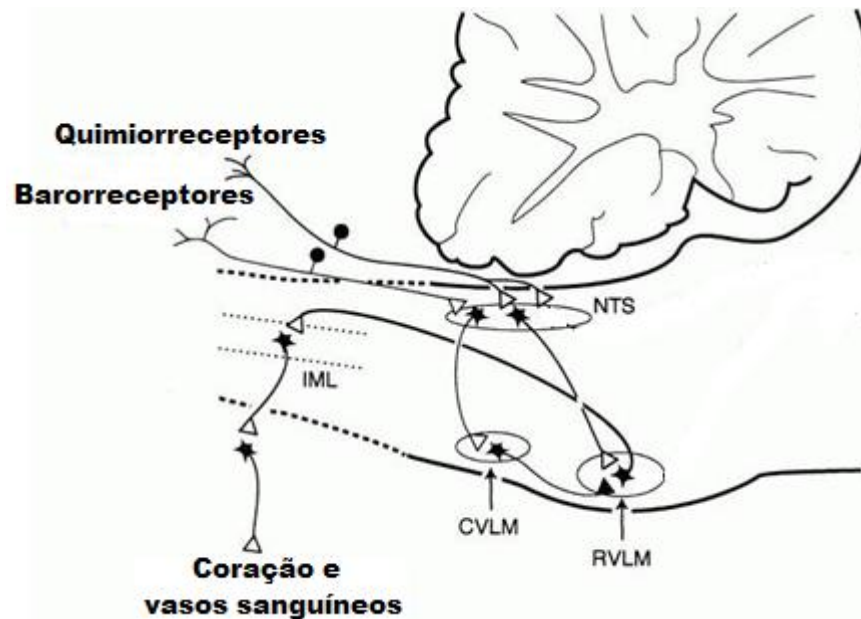
De uma forma simplificada, as fibras dos nervos aórticos e carotídeos que trafegam através dos nervos glossofaríngeo e vago convergem para o NTS, considerado então a primeira estação central dos sinais sensoriais originados do sistema periférico. A partir do NTS, neurônios de segunda ou terceira ordem projetam-se para dois grupamentos de neurônios no bulbo ventrolateral (Figura 1.2):

1) Neurônios inibitórios na área ventrolateral caudal (CVLM) no bulbo raquidiano, que por sua vez projetam-se para neurônios pré-motores (neurônios simpatoexcitatórios) do sistema nervoso simpático na área ventrolateral rostral (RVLM) do bulbo raquidiano. Finalmente, os neurônios da RVLM projetam-se para

os neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático (SNS) localizados na coluna intermediolateral da medula espinhal ("fonte" do fluxo simpático para a periferia, coração e vasos);

2) O outro grupamento de neurônios está localizado no núcleo ambíguo e núcleo dorsal motor do nervo vago, que contêm os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso parassimpático. De cada uma dessas áreas e núcleos bulbares, neurônios projetam-se para áreas e núcleos mais rostrais do SNC levando informações cardiovasculares.

Dessas regiões, de maneira recíproca, partem projeções para as regiões bulbares e até mesmo para os neurônios da coluna intermediolateral da medula, determinando a integração central do controle da pressão arterial (Bucley 1981).



**Figura 1.2:** Representação esquemática das vias aferentes, principais áreas de integração bulbar e vias eferentes do reflexo pressorreceptor arterial. NTS = núcleo do trato solitário; RVLM = área ventrolateral rostral do bulbo; CVLM = área ventrolateral caudal do bulbo; IML = células da medula intermediolateral. Triângulos abertos = impulsos sinápticos excitatórios; Triângulos fechados = impulsos sinápticos inibitórios, adaptado de (Dampney et al. 2002).

Resumindo, o reflexo pressorreceptor participa da homeostase hemodinâmica, principalmente por controlar o tônus simpático e parassimpático para coração e vasos. Exemplificando, a estimulação dos pressorreceptores arteriais

produz redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade vagal, resultando em dilatação arteriolar, venodilatação, bradicardia e redução da contratilidade miocárdica (Melo et al. 2003).

#### **1.4.2. Quimiorreflexo**

Os quimiorreceptores periféricos são constituídos por células altamente especializadas, capazes de detectar alterações da pressão parcial de oxigênio (pO<sub>2</sub>), pressão parcial de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>) e concentração hidrogeniônica (pH) do sangue. Encontram-se distribuídos em corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos), sendo irrigados por sangue arterial através de pequenos ramos que se originam a partir da carótida externa e aorta, respectivamente (Gonzales 1994).

Uma importante característica dessas células quimiorreceptoras refere-se ao fato de estarem intimamente associadas aos capilares sanguíneos, sendo cerca de 25% do volume total do corpúsculo carotídeo ocupado por capilares e vênulas, ou seja, uma vascularização 5 a 6 vezes maior que a do cérebro (Gonzales 1994).

Heymans (1930) foi o primeiro a demonstrar, através de estudos fisiológicos, que a região da bifurcação carotídea constitui-se de uma área reflexogênica sensível à hipóxia (Heymans 1930). Sendo que, além de promover respostas ventilatórias, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos também modifica reflexamente os valores de pressão arterial. Bernthal demonstrou que a estimulação dos quimiorreceptores carotídeos, com cianeto de sódio ou isquemia localizada do corpúsculo carotídeo em cães, promoveu reflexamente taquipnéia, vasoconstrição periférica e hipertensão arterial (Bernthal 1938). Dessa forma, o papel fisiológico dos quimiorreceptores periféricos está relacionado à promoção de ajustes ventilatórios e cardiovasculares no sentido de proporcionar a manutenção da composição química do sangue em níveis ideais, bem como uma pressão de perfusão sanguínea adequada para todos os tecidos.

### **1.5. Drogas Anti-hipertensivas de Ação Central**

As substâncias anti-hipertensivas de ação central se caracterizam por inibir a atividade do sistema nervoso simpático central, com conseqüente redução da

pressão arterial sistêmica. O efeito terapêutico dessa classe de anti-hipertensores resulta, portanto, da inibição de atividade de grupos neuronais no SNC envolvidos no controle da pressão arterial.

A busca de agentes simpaticolíticos a serem utilizados na terapêutica da hipertensão arterial iniciou-se a partir da demonstração de que a retirada da inervação simpática torácica diminui a pressão arterial. A reserpina e a guanetidina, por exemplo, embora já tenham sido extensamente utilizadas no tratamento da hipertensão arterial primária, não mais o são, pela sua alta incidência de efeitos colaterais e baixa tolerabilidade. Posteriormente, com o avanço do estudo do controle central da pressão arterial, principalmente após a demonstração do envolvimento de estruturas bulbares, desenvolveu-se um enfoque racional para a obtenção de substâncias anti-hipertensivas de ação central (Tibirica et al. 1989).

A diminuição do tônus simpático devido à administração intracisternal dessa classe de anti-hipertensivos foi um dos indícios que levaram ao delineamento de seus locais de atuação no bulbo. Esses locais foram posteriormente identificados como a RVLM e o NTS.

### **1.5.1. Clonidina**

A clonidina é um derivado imidazolínico (Figura 1.3) sintetizado no início dos anos 60, com o objetivo de se obter um agonista dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos com atividade vasocronstritora a ser utilizado como descongestionante nasal ou adjuvante de cremes de barbear. Seu efeito hipotensor foi descoberto de maneira totalmente fortuita durante os primeiros ensaios clínicos, onde também se observou bradicardia e sedação (Hardman & Limbird 2007). Na realidade, a clonidina é um agonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos capaz de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica quando administrada por via sistêmica, induzindo então seu efeito hipotensor através da inibição da atividade de estruturas neuronais bulbares envolvidas na regulação cardiovascular. Admite-se, atualmente, que este efeito resulta também de uma interação com receptores imidazolínicos do subtipo  $I_1$ , situados em neurônios bulboespinais da região ventrolateral rostral do bulbo raquidiano (Tibirica et al. 1991; Szabo 2002).

A clonidina reduz a concentração plasmática de noradrenalina assim como a excreção de seus metabólitos pela urina, além de diminuir as concentrações plasmáticas de renina e aldosterona em pacientes com hipertensão arterial.

Finalmente, pode ocorrer redução da resistência vascular renal com a manutenção da perfusão renal.

O mecanismo de ação descrito para a diminuição da pressão arterial está relacionado com o efeito agonista da clonidina sobre os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos localizados no bulbo, os mesmos receptores relacionados com o surgimento de efeitos colaterais – sedação e inibição da secreção de saliva – desta forma, a dificuldade em separar os efeitos desejados dos não desejados, tornou a busca por novas drogas (com maior afinidade pelos receptores imidazolínicos) mais atraente (Tibiriçá 2001).

A caracterização das propriedades farmacológicas dos receptores  $I_1$ -Imidazolínicos, provocou grande avanço no estudo dos anti-hipertensivos de ação central, uma vez que possibilitou a dissociação dos mecanismos farmacológicos envolvidos no efeito terapêutico (controle da pressão arterial) e o principal efeito colateral (sonolência) (van Zwieten et al. 1984). Por outro lado, o efeito sedativo da clonidina é atribuído à sua ação no locus coeruleus, uma estrutura noradrenérgica envolvida na regulação do ciclo sono-vigília. A ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, pela clonidina, reduz a atividade de neurônios noradrenérgicos nessa região, resultando em sonolência (Tibirica et al. 1991).

A clonidina é utilizada no controle da hipertensão arterial primária leve ou moderada. Entretanto, apesar de sua eficácia na redução dos níveis tensionais, a clonidina tem seu uso limitado devido a seus efeitos colaterais e à síndrome de retirada, onde frequentemente ocorre hipertensão rebote. A clonidina também pode ser utilizada no tratamento e prevenção da hiperatividade simpática que ocorrem nas síndromes de abstinência causadas por substâncias tais como tabaco, álcool e narcóticos (Hoffman 2007).

### **1.5.2. Drogas Anti-hipertensivas de ação central de segunda geração**

A segunda geração de drogas anti-hipertensivas de ação central, que inclui a rilmenidina e a moxonidina, surgiu com a perda da prioridade de escolha dos anti-hipertensivos de ação central, como clonidina e metildopa, devido aos seus efeitos colaterais pronunciados. Esses efeitos colaterais levaram pacientes hipertensos ao abandono da terapia.

A rilmenidina (Figura 1.3) é uma oxazolina com estrutura similar às imidazolininas, onde um átomo de nitrogênio do anel imidazólico foi substituído por um

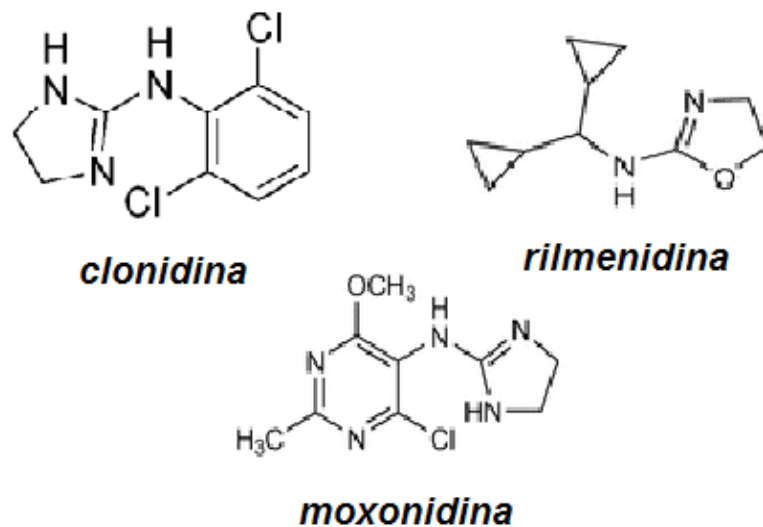


oxigênio. A combinação da eficácia em baixar a pressão arterial e a meia-vida longa da rilmenidina, tornou-a mais útil na terapia anti-hipertensiva (Bricca et al. 1989).

Apesar de menos potente que a clonidina na redução da hipertensão, a rilmenidina possui afinidade trinta vezes maior para os receptores imidazolínicos, do que para os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Por apresentar menor afinidade pelos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, a rilmenidina causa menor efeito sedativo, já que a ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos inibe a atividade neuronal no locus coeruleus (Tibirica et al. 1991).

Em populações com risco cardiovascular aumentado, como por exemplo pacientes idosos, diabéticos ou portadores de doença renal crônica, a rilmenidina também foi eficaz em reduzir a pressão arterial, de modo semelhante à metildopa e à clonidina, com a vantagem da menor incidência de efeitos adversos (Van Zwieten & Peters 1999). Além disso, o tratamento com rilmenidina reduz, de maneira significativa, os níveis plasmáticos de glicose e insulina após teste de tolerância oral à glicose em pacientes com síndrome metabólica, sugerindo efeitos benéficos sobre o metabolismo da glicose (De Luca et al. 2000).

A moxonidina é uma imidazolina, que assim como a rilmenidina, induz seu efeito anti-hipertensivo pela ativação dos receptores  $I_1$  Imidazolínicos situados em neurônios do bulbo raquidiano (Van Zwieten & Peters 1999). Assim como a rilmenidina, a moxonidina apresenta alta seletividade pelos receptores  $I_1$ , com relação aos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, e desse modo é um agente bastante efetivo no controle da pressão arterial, sem induzir sonolência significativa. De qualquer forma, os efeitos colaterais mediados pela ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ainda podem ser vistos em doses elevadas das drogas de segunda geração.



**Figura 1.3:** Estruturas químicas de anti-hipertensivos de ação central.

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

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Investigar os efeitos do tratamento crônico com fármacos anti-hipertensivos de ação central sobre as alterações microcirculatórias de ratos espontaneamente hipertensos.

### **Objetivos Específicos**

- ❖ Investigar os efeitos do tratamento sobre a densidade capilar funcional na pele e no músculo esquelético de SHR;
- ❖ Investigar os efeitos do tratamento sobre a densidade capilar estrutural no músculo esquelético e no ventrículo esquerdo de SHR;
- ❖ Correlacionar os efeitos do tratamento sobre a densidade capilar funcional na pele e no músculo esquelético de SHR;
- ❖ Investigar os efeitos do tratamento sobre a massa do ventrículo esquerdo de SHR.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Modelos Animais**

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

Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (ciclos de 12-12h claro-escuro) e temperatura ( $22 \pm 1$  °C) com acesso livre a água e ração padrão até o dia do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo número P 0034-08).

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), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1 mg/kg/dia) e moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia) Um grupo de 10 ratos WKY foi tratado com veículo durante 28 dias e foi considerado como o grupo controle normotenso (WKY + VEI).

#### **3.2. Medidas Hemodinâmicas**

Foram realizadas medidas da pressão arterial sistólica (Ciuffetti et al.) (Ciuffetti et al.) e diastólica em animais conscientes, através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, *Visitech blood pressure analysis system*, USA), 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 ao procedimento experimental. A PA era medida antes do início do tratamento e após a quarta semana, sendo adquiridas 15 medidas individuais por animal e utilizada a média destas medidas.

### 3.3. 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 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, USA).

Na avaliação da microcirculação do músculo esquelético, uma incisão mediana foi feita na pele da pata esquerda assim como na fáscia ventral da coxa, permitindo a visualização do músculo grácil. O músculo foi então colocado sob o microscópio, de modo que permanecesse sob o feixe de luz. Para a avaliação da microcirculação cutânea, a pele da orelha foi raspada 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, USA) acoplado a um sistema de câmera de vídeo digital (Optronics, Goleta, CA, USA). Foi utilizada uma objetiva Olympus 10x nos experimentos produzindo um aumento final de 100x no monitor. Após a administração i.v. de 0,15 mL de fluoresceína-isotiocianato (FITC)-dextran a 5% (peso molecular de 150.000), as imagens da microcirculação do músculo e pele foram obtidas sucessivamente para contagem em tempo real dos capilares com o auxílio do 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  $1 \text{ mm}^2$  e, nesta área, foram contados todos os capilares espontaneamente perfundidos durante um período de 4 minutos. Foram considerados capilares perfundidos apenas os vasos que permitissem o fluxo contínuo e unitário de hemácias pelo vaso. Além disso, toda vez que ocorresse a ramificação do capilar, os vasos originados desta ramificação eram considerados como sendo novos capilares. O valor total de capilares contados foi considerado como sendo a densidade capilar funcional muscular esquelética. Após a contagem, eram feitas 4 fotos representativas do campo microscópico utilizado, através do 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 paraformaldeído a 4% para análises morfológicas.

#### **3.4. Avaliação da hipertrofia do ventrículo esquerdo**

Após sacrifício 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 (Scherle 1970). 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 massa VE/massa corporal (mg/g).

#### **3.5. 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  $5 \mu\text{m}$

com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2125, Germany). A seguir, o material foi marcado com uma lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada a FITC, que permite a identificação de células endoteliais, a uma diluição de 1:20 em um ambiente escuro à temperatura ambiente por 30 min.

As lectinas são proteínas, geralmente derivadas de plantas, que mostram ligação reversível e seletiva para sacarídeos terminais. Para fins histoquímicos as lectinas podem ser utilizadas 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-B<sub>4</sub> (Hansen-Smith et al. 1988). Porém, diferentes graus de ligação são observados entre a porção arterial e venosa dos vasos, com uma redução marcante dos sítios de ligação para as vênulas. Além disso, este estudo mostrou que a GSI marcou significativamente mais capilares e arteríolas terminais do que técnicas histoquímicas como a medida da atividade da fosfatase alcalina. Essas observações sugerem que a lectina GSI pode ser extremamente útil como um marcador para a microcirculação de músculo esquelético em muitos tipos de experimentos fisiológicos.

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

A densidade capilar do ventrículo esquerdo foi determinada utilizando o método *orientator* (Mattfeldt et al. 1990). 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 contenham 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 ( $V_{v[cap]}$ ) e da densidade de volume de fibras ( $V_{v[fib]}$ ) foram determinadas utilizando o método do “intercepto do ponto-amostrado” anteriormente descrito por Gundersen & Jensen (Gundersen & Jensen 1985) para tecidos AUI. Neste procedimento, pelo menos 7 campos microscópicos de três seções do tecido para cada animal e dez animais por grupo foram aleatoriamente analisados (210 campos por grupo). Um sistema-teste consistindo de linhas paralelas associadas com 56 pontos-teste foi superposto em cada campo microscópico, com o auxílio do programa Saisam 5.1.3.

A densidade de volume de capilares ( $V_{v[cap]}$ ) foi calculada da seguinte forma:  $V_{v[cap]} = P_p / P_T$  (%), onde  $P_p$  é o número de pontos-teste que superpõem capilares e  $P_T$  é o número total de pontos-teste ( $P_T = 56$  neste caso). A densidade de volume de fibras foi calculada de forma similar. A razão entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras ( $V_{v[cap]} / V_{v[fib]}$ ) 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 56 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 (Skyschally et al. 2003):

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



Sendo:

EPR – Erro padrão relativo

Vv – densidade de volume da estrutura em análise

n – número de pontos a serem contados

Tabela 3.1 – Densidade de volume de capilares

| Grupos de Animais<br>(n = 10) | Densidade de volume de capilares<br>média após 28 dias de tratamento |
|-------------------------------|--|
| WKY + VEI                     | 0,53   |
| SHR + VEI                     | 0,27   |
| SHR + CLO                     | 0,31   |
| SHR + RIL                     | 0,28   |
| SHR + MOX                     | 0,31   |
| Média de todos os grupos      | 0,34   |

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), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

Assim temos:

$$0,05 = \frac{\sqrt{(1 - 0,34)}}{n} \quad \text{logo,}$$

$$n = 264$$

Posto que o  $Vv = 0,34$ , este só ocupa 34% do tecido, por isso o resultado encontrado  $n = 264$  deve ser corrigido para o  $Vv$  de nosso material, assim:

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

$$n_{\text{corrigido}} = 776$$

Ou seja, o mínimo de pontos a serem contados em nossa amostra deve ser 776. Assim, o número de pontos contados ( $n = 3920$ ) supera bastante este mínimo, sendo considerado adequado para o nosso estudo.

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

### 3.7. Drogas

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

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeitos do tratamento com anti-hipertensivos de ação central na pressão arterial e na frequência cardíaca

No início do tratamento, 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 entre os diferentes grupos de SHR. A Tabela 4.1 mostra os valores médios de PAS nos diferentes grupos de animais.

**Tabela 4.1** – Pressão arterial sistólica basal e após tratamento crônico em diferentes grupos

| Grupos    | PAS          | PAS          |
|-----------|--------------|--------------|
|           | Basal (mmHg) | Final (mmHg) |
| WKY + VEI | 123 ± 3      | 125 ± 3      |
| SHR + VEI | 195 ± 6#     | 198 ± 4#     |
| SHR + CLO | 197 ± 3#     | 121 ± 4*     |
| SHR + RIL | 192 ± 6#     | 119 ± 3*     |
| SHR + MOX | 192 ± 3#     | 125 ± 3*     |

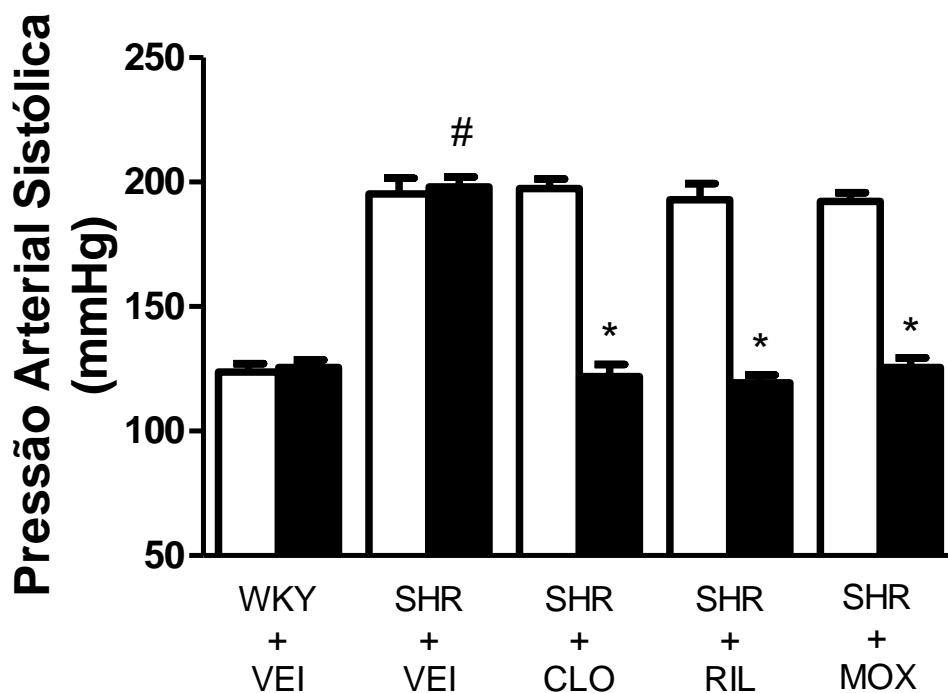
Pressão arterial sistólica basal (antes do tratamento oral) e final nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados por gavagem por 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

Os valores representam a média ± EPM de 10 animais.

\*  $p < 0,0001$  vs. valores basais.

#  $p < 0,0001$  vs. WKY.

O tratamento oral crônico de SHR durante 28 dias com as diferentes drogas anti-hipertensivas estudadas foi capaz de normalizar os valores médios da PAS quando comparados com os normotensos. 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 e 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), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidna (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

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

\*  $p < 0,0001$  vs. valores basais.

#  $p < 0,0001$  vs. WKY.

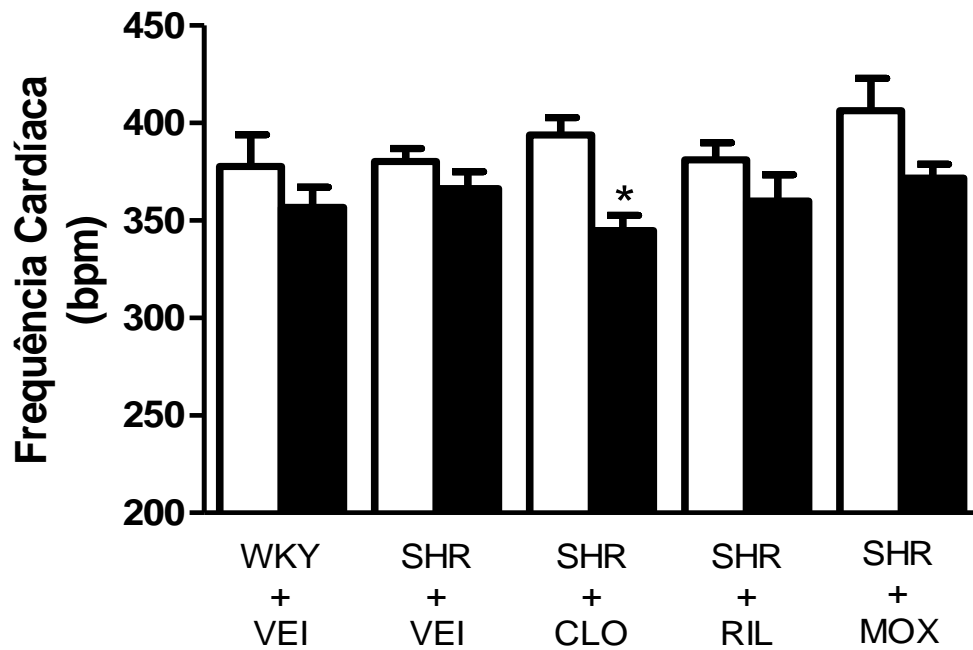
Apenas o grupo tratado com clonidina foi capaz de reduzir a FC de forma significativa no fim do tratamento (Tabela e Figura 4.2). Os animais tratados com as demais drogas não demonstraram diferença significativa.

**Tabela 4.2** - Efeitos do tratamento na frequência cardíaca (antes e após tratamento crônico)

| <b>Grupos</b>    | <b>FC Basal<br/>(bpm)</b> | <b>FC Final<br/>(bpm)</b> |
|------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>WKY + VEI</b> | <b>377 ± 16</b>           | <b>356 ± 10</b>           |
| <b>SHR + VEI</b> | <b>380 ± 6</b>            | <b>366 ± 8</b>            |
| <b>SHR + CLO</b> | <b>393 ± 3</b>            | <b>344 ± 7*</b>           |
| <b>SHR + RIL</b> | <b>381 ± 8</b>            | <b>360 ± 13</b>           |
| <b>SHR + MOX</b> | <b>406 ± 16</b>           | <b>371 ± 7</b>            |

Frequência cardíaca basal (antes do tratamento oral) e final ± EPM nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos posteriormente tratados com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia). Os valores representam a média ± EPM de 10 experimentos.

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



**Figura 4.2** - Efeitos dos Tratamentos na frequência cardíaca (antes e após tratamento crônico)

Frequência cardíaca basal (antes do tratamento oral) e final nos grupos de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

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

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

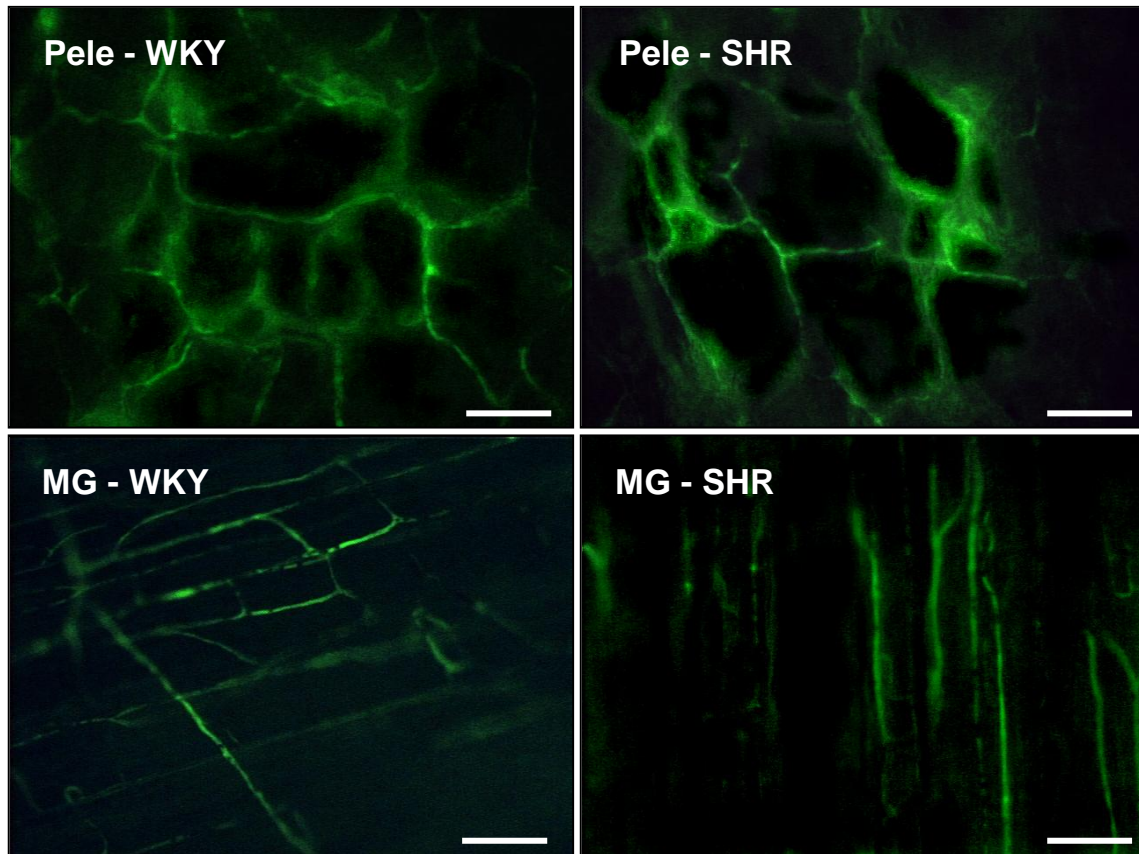
## **4.2 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Funcional do Músculo Esquelético e da Pele**

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 4.3).

Quando comparados com os animais normotensos, o grupo SHR controle mostrou uma densidade capilar funcional significativamente menor tanto no músculo esquelético (WKY + VEI  $425 \pm 22$  e SHR + VEI  $294 \pm 26$  capilares/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,0001$ ) quanto na pele (WKY + VEI  $497 \pm 28$  e SHR + VEI  $332 \pm 17$  capilares/mm<sup>2</sup>,  $p < 0,0001$ ) evidenciando a rarefação capilar funcional característica deste grupo de animais (Tabela 4.3 e Figura 4.4).

O tratamento com os anti-hipertensivos de ação central aumentou significativamente a densidade capilar no músculo grácil e na pele dos animais SHR. Este tratamento também foi capaz de reverter a rarefação capilar funcional nestes animais, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os grupos hipertensos tratados com anti-hipertensivos e o grupo de animais normotensos (WKY + VEI) ( $p > 0,0001$ ) (Tabela 4.3 e Figura 4.4).





**Figura 4.3** – Imagens representativas da videomicroscopia intravital da pele e do músculo grácil (Henrich et al.) de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos (SHR + VEI) após a administração intravenosa de fluoresceína-isotiocianato (FITC) dextran indicando os capilares. Aumento 100x, barra = 100 μm.

O grupo de animais tratados com clonidina (SHR + CLO) apresentou um aumento significativo do número de capilares espontaneamente perfundidos no músculo esquelético em relação ao grupo de animais normotensos (WKY + VEI) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.3** – Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Funcional

| Grupos    | DCF      | DCF        |
|-----------|----------|------------|
|           | Muscular | Cutânea    |
| WKY + VEI | 425 ± 22 | 497 ± 28   |
| SHR + VEI | 294 ± 26 | 332 ± 17#  |
| SHR + CLO | 511 ± 12 | 533 ± 22*§ |
| SHR + RIL | 505 ± 11 | 534 ± 23*  |
| SHR + MOX | 495 ± 14 | 482 ± 11*  |

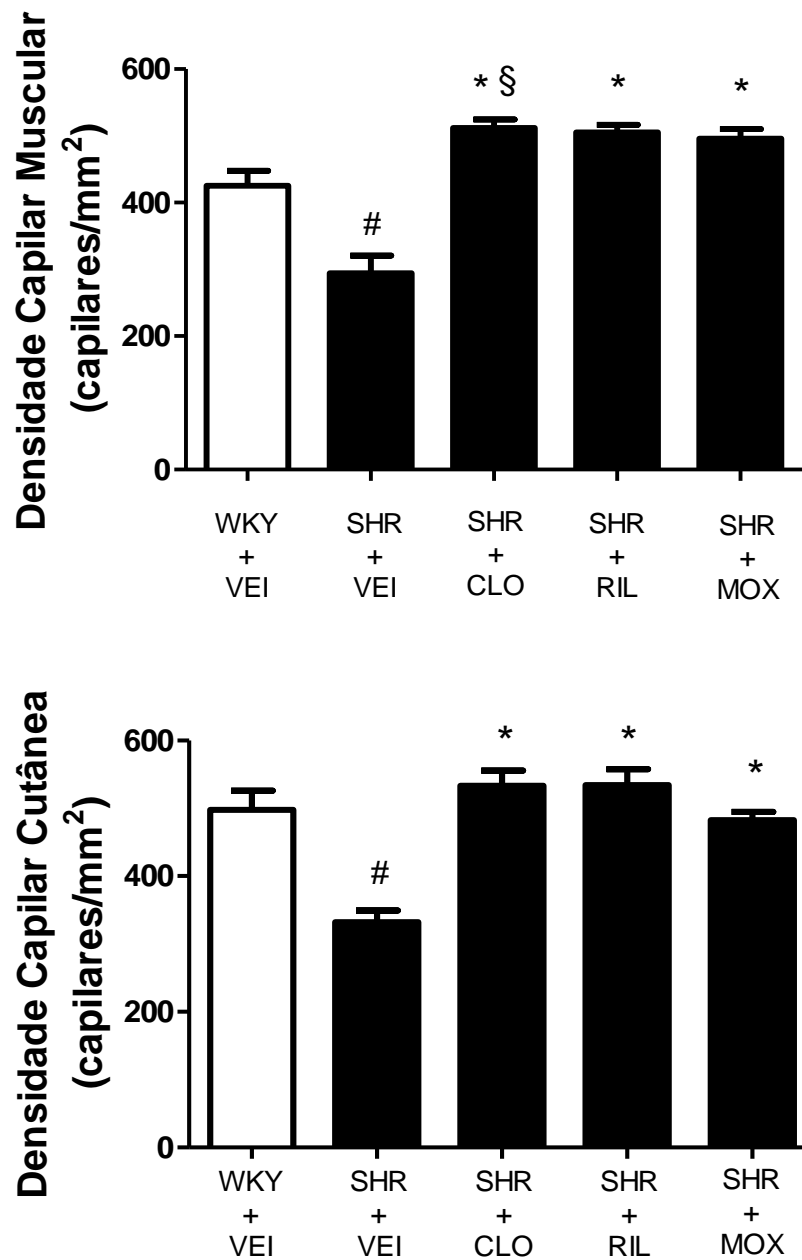
Densidade capilar funcional (capilares/mm<sup>2</sup>) no músculo esquelético e na pele da orelha de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados por via oral durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia), moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

Os valores representam a média ± EPM de 10 experimentos.

\*  $p < 0,0001$  vs. grupo SHR + VEI.

#  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.

§  $p < 0,05$  vs. grupo WKY + VEI.



**Figura 4.4** – 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), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia). Os valores representam uma média  $\pm$  EPM de 10 animais.

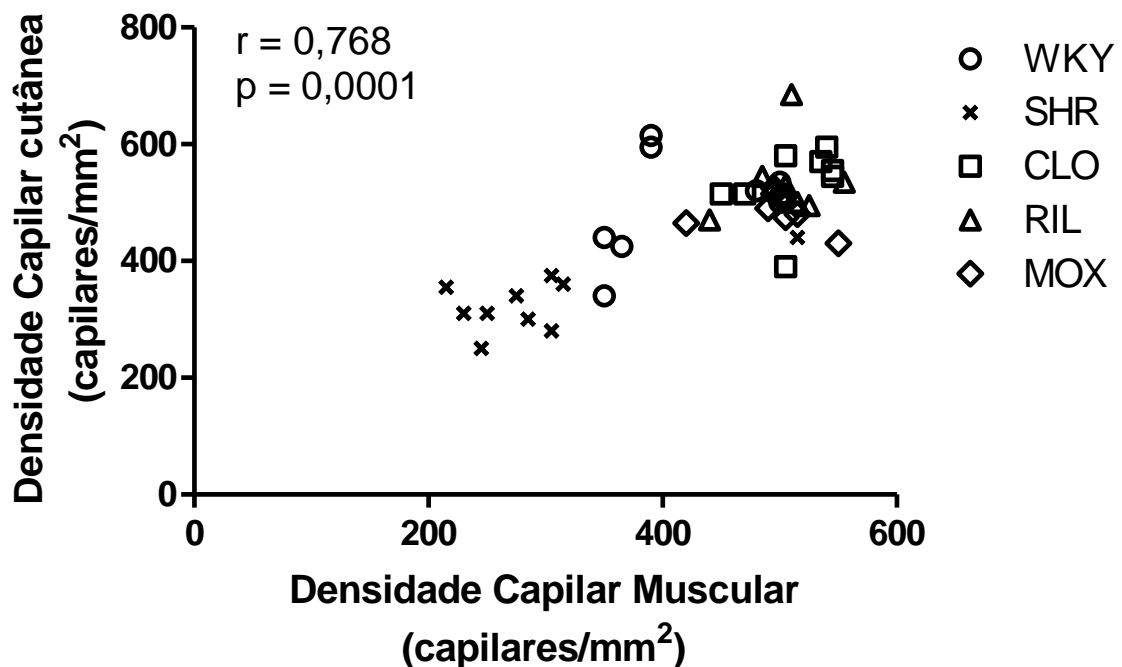
\*  $p < 0,0001$  vs. grupo SHR + VEI.    #  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.

§  $p < 0,05$  vs. grupo WKY + VEI.

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

A semelhança entre os resultados obtidos para a densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele da orelha dos diferentes grupos de tratamento estudados, suscitaram a possibilidade de uma relação linear entre estes resultados.

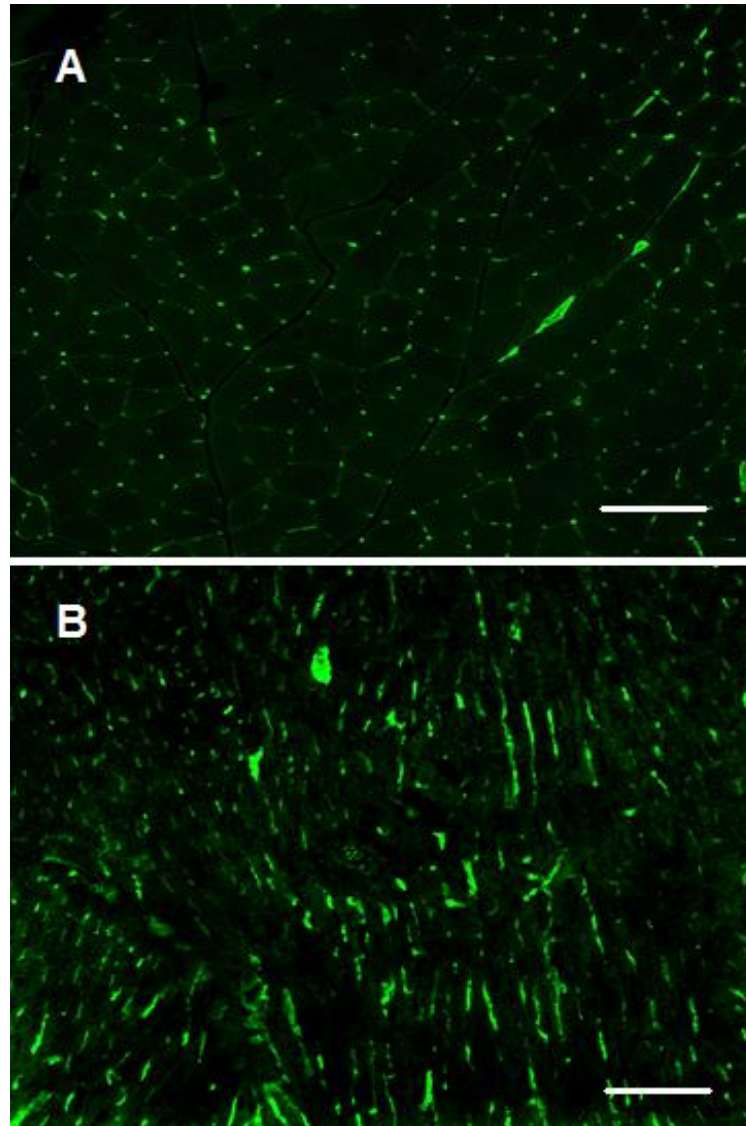
A figura 4.5 mostra a existência de uma correlação linear entre a densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele, incluindo animais normotensos, bem como animais hipertensos tratados com anti-hipertensivos ou veículo (coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0,768$ ,  $n = 50$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 4.5** – Correlação entre a densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

#### **4.4 - Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Esquelético e do Ventrículo Esquerdo**

A figura 4.6 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 4.6** – Imagens representativas de fotomicrografias adquiridas utilizando microscopia fluorescente confocal 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  $\mu$ m.

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  $1,78 \pm 0,08$  e SHR + VEI  $1,23 \pm 0,02$  capilar/fibra muscular,  $p < 0,0001$ ), evidenciando a rarefação capilar estrutural característica deste grupo de animais (Tabela 4.4 e Figura 4.7).

Todos os tratamentos aumentaram significativamente a relação capilar/fibra no músculo grácil dos animais SHR. Além disso, estes tratamentos também foram capazes de reverter a rarefação capilar estrutural no músculo esquelético destes animais, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os grupos hipertensos tratados com anti-hipertensivos e o grupo de animais normotensos (WKY + VEI) (Tabela 4.4 e Figura 4.5).

**Tabela 4.4** – Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Músculo Esquelético

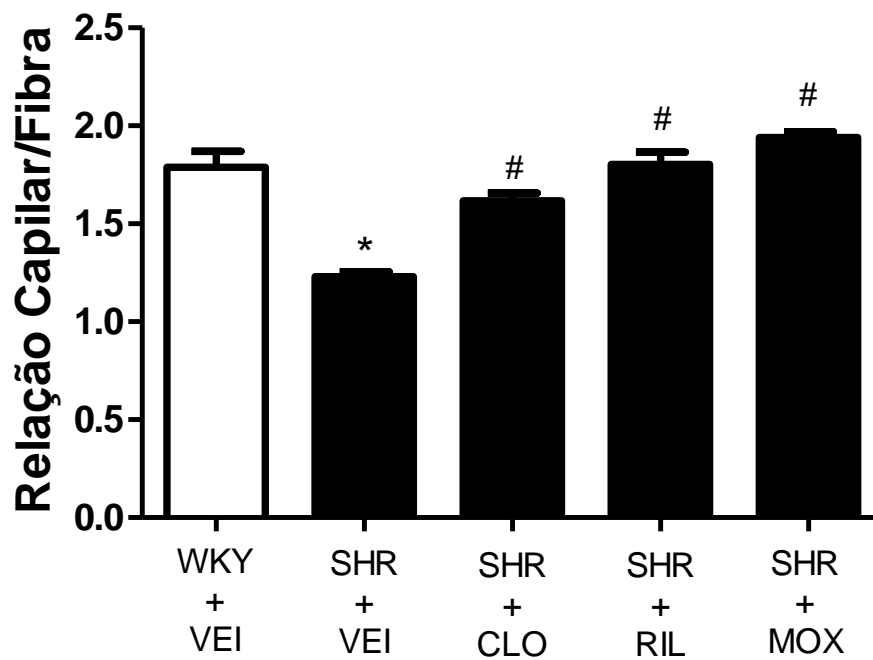
| Grupo            | Relação capilar/fibra no músculo esquelético |
|------------------|--|
| <b>WKY + VEI</b> | <b><math>1,78 \pm 0,08</math></b>            |
| <b>SHR + VEI</b> | <b><math>1,23 \pm 0,02^*</math></b>          |
| <b>SHR + CLO</b> | <b><math>1,61 \pm 0,03^\#</math></b>         |
| <b>SHR + RIL</b> | <b><math>1,80 \pm 0,06^\#</math></b>         |
| <b>SHR + MOX</b> | <b><math>1,94 \pm 0,02^\#</math></b>         |

Relação capilar/fibra no músculo esquelético de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia) (n = 10).

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

\*  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.

^\#  $p < 0,0001$  vs. grupo SHR + VEI.



**Figura 4.7** – Relação capilar/fibra no músculo esquelético de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

Os valores representam a média ± EPM de 10 animais.

\*  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.

#  $p < 0,0001$  vs. grupo SHR + VEI.



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 4.5).

Ao contrário do resultado encontrado no músculo esquelético, o tratamento com clonidina, rilmenidina ou moxonidina não foi capaz de alterar a  $Vv[cap]/Vv[fib]$  no ventrículo esquerdo dos animais SHR (Tabela 4.5 e Figura 4.8).

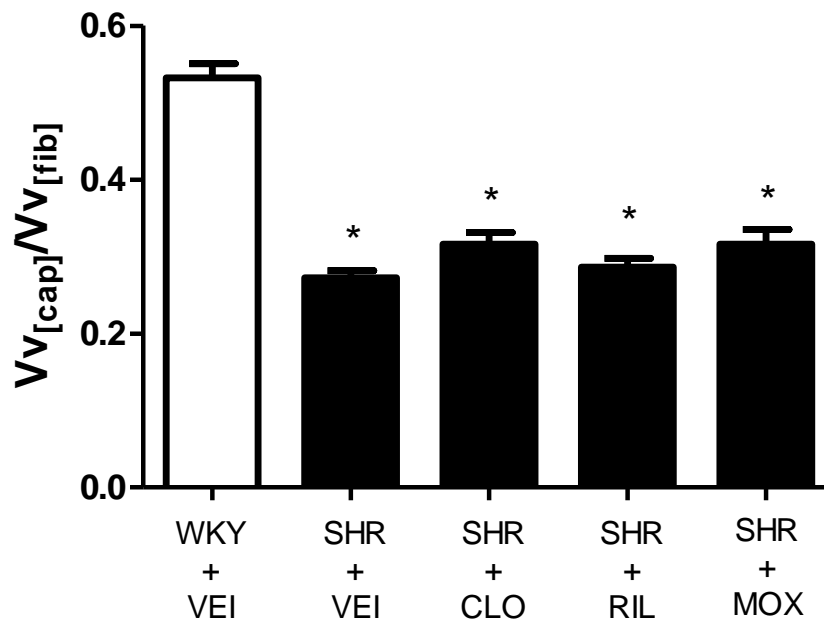
**Tabela 4.5** – Efeitos do Tratamento na Densidade Capilar Estrutural do Miocárdio

| Grupo            | Relação capilar/fibra no músculo cardíaco |
|------------------|---|
| <b>WKY + VEI</b> | <b>0,53 ± 0,01</b>                        |
| <b>SHR + VEI</b> | <b>0,27 ± 0,01*</b>                       |
| <b>SHR + CLO</b> | <b>0,31 ± 0,01*</b>                       |
| <b>SHR + RIL</b> | <b>0,28 ± 0,01*</b>                       |
| <b>SHR + MOX</b> | <b>0,31 ± 0,01*</b>                       |

Relação ( $Vv[cap]/Vv[fib]$ ) no ventrículo esquerdo de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

Os valores representam a média ± EPM de 10 animais.

\*  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.



**Figura 4.8** – 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), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

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

\*  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.

#### **4.5 - Efeitos do Tratamento sobre a Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo**

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 (Tabela 4.6).

O tratamento crônico com clonidina ou moxonidina não alterou a relação VE/massa corporal. Por outro lado, a rilmenidina foi capaz de reverter a HVE presente neste modelo de hipertensão arterial.

**Tabela 4.6** – Efeitos do Tratamento Sobre a Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo

| Grupo            | Relação VE/Massa corporal<br>(mg/g) |
|------------------|-------------------------------------|
| <b>WKY + VEI</b> | <b>1,69 ± 0,03</b>                  |
| <b>SHR + VEI</b> | <b>2,39 ± 0,08#</b>                 |
| <b>SHR + CLO</b> | <b>2,46 ± 0,05#</b>                 |
| <b>SHR + RIL</b> | <b>2,04 ± 0,06*</b>                 |
| <b>SHR + MOX</b> | <b>2,47 ± 0,13#</b>                 |

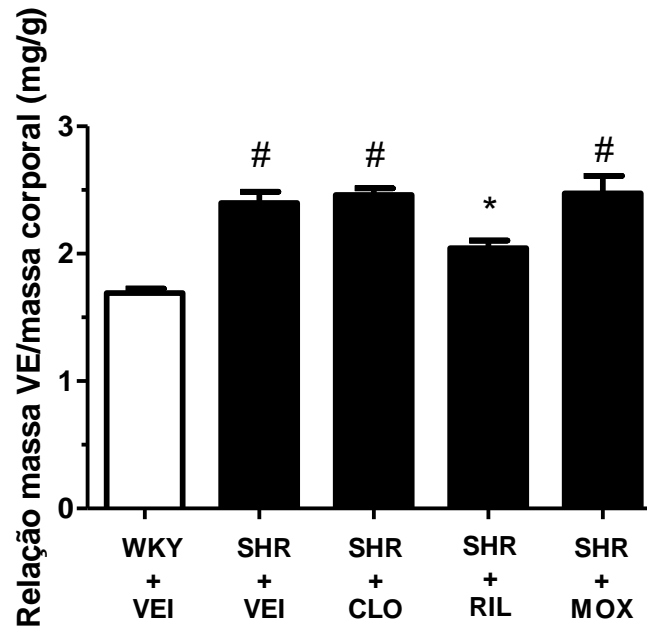
Relação VE/Massa corporal (mg/g) de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

Os valores representam a média ± EPM de 10 animais.

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

#  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.

**Figura 4.9** – Efeitos do Tratamento Sobre a Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo



Relação VE/Massa corporal (mg/g) de ratos normotensos (WKY + VEI) e hipertensos tratados oralmente durante 28 dias com veículo (SHR + VEI), clonidina (SHR + CLO, 0,1 mg/kg/dia), rilmenidina (SHR + RIL, 1,0 mg/kg/dia) ou moxonidina (SHR + MOX, 10 mg/kg/dia).

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

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

#  $p < 0,0001$  vs. grupo WKY + VEI.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central reverte a rarefação capilar funcional e estrutural no músculo esquelético de SHR. Esses resultados constituem a primeira demonstração dos efeitos da inibição simpática central sobre alterações microvasculares típicas da hipertensão arterial.

Neste trabalho, foi utilizado o modelo de hipertensão primária SHR por se tratar do modelo experimental universalmente utilizado no estudo da HAS. A linhagem de SHR foi obtida por Okamoto e Aoki (1963) a partir de ratos Wistar. A pressão desses ratos eleva-se a partir de 5-6 semanas de idade atingindo valores sistólicos de 180-200 mmHg quando adultos (Trippodo & Frohlich 1981).

Em geral, os SHR são obtidos pela seleção de animais com o fenótipo desejado ao longo de várias gerações e, uma vez que o traço genético é fixado, o mesmo é mantido por cerca de 20 gerações para alcançar uma homogeneidade genética. Esta técnica é utilizada para se desenvolver, a partir de linhagens Wistar, modelos importantes como o SHR (Okamoto & Aoki 1963). Os mecanismos genéticos da hipertensão em SHR têm sido atribuídos tanto a alterações neurais quanto vasculares. Variações individuais no histórico genético do SHR podem influenciar a evolução da hipertensão e as lesões de órgãos-alvo nesse modelo, onde a hipertensão está associada também à hipertrofia cardíaca, disfunção endotelial e insuficiência renal (proteinúria, depuração da creatinina diminuída), porém não são observadas de forma consistente insuficiência cardíaca e insuficiência renal (Trippodo & Frohlich 1981).

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 (Hu et al. 1996; Zhang et al. 1996). 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 (Chou et al. 1998). Embora a eNOS esteja aumentada, aparentemente ela não está acoplada e ativa, uma vez que ao se tratar SHR com BH4, um co-fator da NOS, observa-se uma redução na pressão arterial (Paravicini & Touyz 2006). A importância dos fatores neurais no desenvolvimento do SHR foi demonstrada por meio da redução da pressão arterial, em resposta à ablação cirúrgica ou farmacológica do sistema nervoso autônomo simpático (Trippodo & Frohlich 1981) e a caracterização da hiperatividade simpática encontrada neste modelo (Lundin et al. 1984).

No presente estudo, conforme esperado, foi visto que todas as drogas foram capazes de normalizar 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.

Apesar da semelhança nos resultados encontrados sobre a pressão arterial, ao fim do tratamento crônico apenas os animais tratados com clonidina mostraram uma redução da frequência cardíaca, enquanto os outros grupos apresentaram uma pequena tendência. Resultado este que confirma dados da literatura que concedem à clonidina uma maior ação periférica em relação às outras drogas devido à inibição do influxo simpático ao coração através da ativação de receptores  $\alpha_2$  pré-sinápticos responsáveis pela diminuição da liberação de noradrenalina nas fendas sinápticas (van Zwieten et al. 1984; Szabo 2002).

O uso da microscopia intravital, através da técnica de epi-iluminação acoplada à fluorescência, 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.

A escolha da pele se deu em virtude de sua ampla utilização em pesquisa clínica na determinação da densidade capilar funcional, devido ao acesso não-invasivo a este leito microvascular através de técnicas de vídeo microscopia intravital. Além

disso, já foi demonstrado em humanos que as alterações microvasculares cutâneas, tais como a vasodilatação dependente de endotélio e o recrutamento capilar alterados, estão relacionadas com o aumento do risco cardiovascular, avaliado através do risco de desenvolvimento de doença coronariana (IJzerman et al. 2003).

Já o tecido muscular esquelético foi investigado em virtude de sua importante participação na determinação da resistência vascular periférica. O uso do músculo grácil ocorreu pelo extenso uso do mesmo em diversos trabalhos descritos na literatura (Prewitt et al. 1982; Amaral et al. 2000; Melo et al. 2003) afim de determinar a densidade capilar funcional (DCF) e em função da facilidade de acesso ao mesmo para a visualização sob o microscópio.

No presente trabalho, em primeiro lugar 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. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que descrevem modificações funcionais na microcirculação destes animais (Vicaut 1999; Feihl et al. 2006).

O tratamento dos ratos SHR com diferentes fármacos anti-hipertensivos promoveu modificações semelhantes na DCF destes animais na pele e no músculo grácil. Foi visto que as drogas utilizadas aumentaram o número de capilares espontaneamente perfundidos em ambos os leitos. Esse efeito deve-se provavelmente à inibição simpática central e redução do tônus simpático para a periferia, resultando em vasodilatação ao nível de arteríolas e esfíncter pré-capilares e o conseqüente recrutamento capilar. Nesse contexto, um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a administração de rilmenidina e clonidina diretamente no sistema nervoso central promove dilatação da microcirculação mesentérica de SHR em doses que não induzem efeitos cardiovasculares quando administradas por via sistêmica (Estate et al. 2004).

Apesar da semelhança dos resultados encontrados na DCF muscular e cutânea dos diferentes grupos de tratamento, os animais tratados com clonidina apresentaram um aumento da DCF muscular que se mostrou significativamente

maior que os valores encontrados no grupo de animais normotensos. 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 (Serne et al. 2001; Debbabi et al. 2006). No estudo clínico realizado por Debbabi e colaboradores (2006) estes autores confirmaram a rarefação da densidade capilar em pacientes com hipertensão primária não tratada, e verificaram que pacientes hipertensos tratados apresentavam um aumento da densidade capilar cutânea superior ao grupo controle normotenso. Constatou-se uma correlação estatisticamente significativa entre os valores de densidade capilar funcional no músculo esquelético e na pele, quando comparados todos os valores referentes a todos os grupos de animais estudados.

Tendo em vista que as medidas de densidade capilar em pesquisa clínica são realizadas de forma não-invasiva, utilizando a pele (Antonios et al. 1999; Hasan et al. 2002; Debbabi et al. 2006), este resultado possui um significado clínico importante. Desta forma, o presente estudo, assim como outro estudo recente do nosso laboratório (Sabino et al. 2008), mostrou que, pelo menos neste modelo animal, os dados de densidade capilar funcional observados na pele podem ser extrapolados para o músculo esquelético e provavelmente podem refletir o número de capilares perfundidos em órgãos de maior interesse clínico, como coração, cérebro e rins.

Conforme descrito anteriormente, o músculo esquelético possui participação importante na determinação da resistência vascular periférica. Além disso, também foi mostrado que a resistência vascular periférica aumentada é a principal alteração hemodinâmica que mantém a pressão arterial elevada em pacientes hipertensos (Kaplan & Flynn 2006) e que este aumento pode ocorrer, pelo menos em parte em função da rarefação capilar observada nestes pacientes (Struijker Boudier et al. 1992; Levy et al. 2001). Assim, é fundamental o conhecimento dos efeitos do tratamento farmacológico sobre a DCF na pele, pois estes dados podem ser usados para se conhecer a eficácia clínica do tratamento farmacológico no que se refere aos efeitos sobre a microcirculação. Dessa forma, os estudos realizados na microcirculação da pele de pacientes hipertensos, como o estudo observacional realizado por Debbabi e colaboradores (2006) descrito anteriormente, podem ser



utilizados para a predição dos efeitos de tratamentos farmacológicos sobre a microcirculação de órgãos-alvo da doença hipertensiva.

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, que se liga com alta afinidade no endotélio capilar.

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

No coração (ventrículo esquerdo), em virtude da orientação anisotrópica deste tecido, os cortes transversais realizados no mesmo não foram capazes de reproduzir uma orientação definida de capilares e fibras musculares. Assim, estes cortes produziam padrões de imagens com capilares orientados transversalmente e longitudinalmente ao eixo de corte, não permitindo uma comparação em relação a uma análise morfológica quantitativa de capilares e fibras musculares. Optamos então por utilizar o método *orientator* que permite a obtenção de seções aleatórias uniformemente isotrópicas, ou seja, seções que apresentam as mesmas características em todas as direções, já descrito anteriormente (Mattfeldt et al. 1990). A relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras musculares neste tecido foi tomada como sendo o parâmetro de densidade capilar estrutural no ventrículo esquerdo. Novamente, este parâmetro foi preferido em relação à densidade de volume de capilares isoladamente, já que é bem

conhecida a existência de hipertrofia das fibras cardíacas no ventrículo esquerdo em hipertensos, o que poderia resultar em variações na densidade capilar estrutural não relacionadas ao tratamento farmacológico.

O estudo da densidade capilar estrutural neste tecido é importante, já que se trata de um leito vascular comumente envolvido em lesões de órgão-alvo em pacientes hipertensos crônicos não tratados. A HAS pode agravar o quadro da doença cardíaca isquêmica e, eventualmente, a insuficiência cardíaca congestiva que são acompanhadas da hipertrofia do ventrículo esquerdo (Casale et al. 1986; Levy et al. 1990; Koren et al. 1991). No entanto, as alterações da microcirculação coronariana na hipertrofia do ventrículo esquerdo parecem ter um papel importante nestes casos (Marcus et al. 1987; Vogt et al. 1990). Assim, a avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos farmacológicos sobre a densidade capilar estrutural neste tecido permite diferenciar os fármacos estudados quanto à capacidade de reduzir/prevenir a ocorrência de lesões de órgão-alvo e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Inicialmente, o presente estudo demonstrou 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 (Boegehold et al. 1991; Scheidegger et al. 1996) quanto no ventrículo esquerdo (Rakusan et al. 1984; Engelmann et al. 1987) e favorecem a hipótese de que a rarefação capilar estrutural seja uma consequência do fechamento crônico de pequenos vasos da microcirculação devido ao aumento de catecolaminas plasmáticas caracterizando um estado de hiperatividade simpática comum na fisiopatologia da hipertensão arterial. Além disso, Korner (2007) atribui a rarefação microvascular na hipertensão ao aumento da vasoconstrição e fechamento de pequenos vasos e capilares. Essa hipótese também é favorecida mediante os resultados encontrados no músculo esquelético, onde os animais tratados com as drogas anti-hipertensivas de ação central apresentaram uma reversão da rarefação capilar encontrada no controle hipertenso SHR. Esses resultados sugerem que a inibição simpática central pode resultar em angiogênese neste leito vascular

especificamente, sugerindo um efeito benéfico da modulação da atividade simpática sobre a microcirculação de ratos hipertensos.

O aumento do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, que antes se encontrava reduzido devido ao fechamento crônico de capilares, estado característico da hiperatividade simpática presente nesses animais, estimularia o crescimento de novos vasos através do aumento do estresse de cisalhamento na parede do vaso devido à vasodilatação causada pelos fármacos, aumentando a rede de capilares para uma maior perfusão no músculo grácil, tecido adaptado a uma baixa perfusão (Fulgenzi et al. 1998; Zhou et al. 1998).

Por outro lado, nenhuma das drogas utilizadas para o tratamento crônico foi capaz de reverter a rarefação capilar presente no ventrículo esquerdo dos SHR. Este resultado estaria de acordo com trabalhos científicos, tal qual o realizado por Van Kerckhoven e colaboradores (2004) onde foi visto que o tratamento com moxonidina não foi capaz de aumentar a relação capilar/miócito de ratos infartados, indicando que não houve crescimento de novos capilares. Por outro lado, já foi demonstrada a reversão da rarefação capilar miocárdica em um modelo experimental de falência renal induzida por uma nefrotomia subtotal em ratos tratados com moxonidina (Tornig et al. 1996).

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 (Levy et al. 2008). Essa diferença pode ter determinado os resultados distintos apresentados nesse estudo quando comparamos os efeitos dos diferentes fármacos na densidade capilar estrutural do músculo grácil e do ventrículo esquerdo após tratamento crônico.

A hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) representa frequente complicação da hipertensão arterial, sendo sua prevalência dependente das características da população estudada, variando, por avaliação ecocardiográfica, de 20% em hipertensos leves a 70% em formas mais avançadas (Levy et al. 1990). Epidemiologicamente estabelecida como importante fator de risco para alguns

eventos cardiovasculares e marcador de risco para ocorrências vasculares como acidente vascular encefálico (Lorell & Carabello 2000).

Para estudar os efeitos do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre a HVE em SHR fez-se uso do modelo de determinação volumétrica de órgãos 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 hipertrofia ventricular presente no modelo de hipertensão SHR foi demonstrada através da comparação com animais do grupo controle normotenso. Fatores de ordem genética desempenham papel relevante na determinação de HVE, e estão mais correlacionados com a hipertrofia vista em SHR (Dahlof et al. 2005), conforme estudo realizado em 1994 que verificou a associação do risco de desenvolver HVE com a presença de polimorfismo no alelo D (DD) do gene da ECA, que pode servir como marcador genético (Schunkert et al. 1994). Além disso, a ativação de calcineurina, uma fosfatase protéica amplamente disponível nas diferentes células do organismo e que promove desfosforilação de fatores de transcrição determinando a expressão de genes que conduzem à hipertrofia, tem sido também reconhecida como possível área de interesse para o entendimento da hipertrofia cardíaca (Ritter et al. 2002). Em humanos, sabe-se que uma dieta rica em sal também determina maior aparecimento de HVE. O sódio não apenas proporciona cifras pressóricas mais elevadas, assim como também promove alterações celulares que resultam em hipertrofia (Dahlof et al. 2005).

Diversos estudos clínicos têm demonstrado a eficácia de drogas anti-hipertensivas de ação central, como a clonidina, rilmenidina e moxonidina na regressão da HVE em períodos de tratamento que variam de 8 – 12 meses (Timio et al. 1987; Sadowski et al. 1998; Van Zwieten & Peters 1999). Esses trabalhos mostraram que o efeito sobre a hipertrofia não dependia apenas do fármaco adotado para o tratamento, mas também da duração de tratamento e do estado clínico dos pacientes estudados (presença de comorbidades e agravamento do caso).

Em nosso estudo a reversão da HVE foi vista apenas em animais tratados com rilmenidina, no entanto estudos experimentais já descreveram os efeitos sobre o ventrículo esquerdo em animais tratados com clonidina ou moxonidina. Em 1992, Amann e colaboradores (1992) evidenciaram a redução da HVE em SHR tratados com moxonidina por 12 semanas, e Jin XQ e colaboradores (1994) descreveram os mesmos efeitos benéficos sobre a HVE de ratos tratados com clonidina. Do mesmo modo, esses efeitos também encontram-se descritos na literatura através de ensaios clínicos realizados em pacientes hipertensos (Kleine et al. 1987; Ollivier & Christen 1994). Este resultado corrobora com recente trabalho realizado por Koldas e colaboradores. (2003) em um estudo clínico que avaliou os efeitos de apenas 12 semanas de tratamento com rilmenidina em pacientes hipertensos portadores de HVE. Vale ressaltar que a reversão da HVE pelas outras drogas utilizadas neste estudo poderia ser vista caso o tratamento perdurasse por mais tempo, como citam os estudos descritos anteriormente.

O mecanismo envolvido na regressão da HVE não foi estudado neste trabalho e ainda encontra-se não esclarecido, porém em recente estudo Paquette e colaboradores (2008) demonstraram que a redução da hipertrofia do VE em SHR tratados com moxonidina (mesma classe farmacológica que a rilmenidina) estava correlacionada com a redução da concentração de DNA e a inibição da sua síntese no VE (Paquette et al. 2008). Sabe-se que estas drogas possuem efeitos não correlacionados com a ativação dos receptores imidazolínicos, tal como o aumento dos níveis séricos de adiponectina (adipocitocina com propriedades antiaterogênica e sensibilizadora de insulina), visto em ensaios clínicos realizados em pacientes hipertensos tratados com moxonidina e rilmenidina (Nowak et al. 2005; Ebinc et al. 2008). Mesmo a rilmenidina sendo uma droga da mesma classe farmacológica das imidazolininas, ainda cabem estudos para investigar um possível efeito intrínseco da molécula, tendo em vista esta ser a única oxazolina da classe estudada.

## **6. CONCLUSÕES**

No presente estudo, foi demonstrado que o tratamento crônico com rilmenidina é capaz de reverter a hipertrofia do ventrículo esquerdo presente em SHR. Da mesma forma, foi demonstrado 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 anti-hipertensivos que modulam a atividade do sistema nervoso simpático central. Por outro lado, o tratamento não reverteu a rarefação capilar estrutural no ventrículo esquerdo desses animais. Estudos futuros são necessários para verificar os efeitos das drogas anti-hipertensivas de ação central na regulação do processo de angiogênese através de suas diferentes vias de ativação.

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que a terapia anti-hipertensiva com fármacos de ação central, 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

- Amann, K., D. Greber, H. Gharehbaghi, G. Wiest, B. Lange, U. Ganten, T. Mattfeldt and G. Mall (1992). "Effects of nifedipine and moxonidine on cardiac structure in spontaneously hypertensive rats. Stereological studies on myocytes, capillaries, arteries, and cardiac interstitium." Am J Hypertens **5**(2): 76-83.
- Amaral, S. L., T. M. Zorn and L. C. Michelini (2000). "Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **18**(11): 1563-72.
- Antonios, T. F., F. E. Rattray, D. R. Singer, N. D. Markandu, P. S. Mortimer and G. A. MacGregor (1999). "Maximization of skin capillaries during intravital video-microscopy in essential hypertension: comparison between venous congestion, reactive hyperaemia and core heat load tests." Clin Sci (Lond) **97**(4): 523-8.
- Antonios, T. F., D. R. Singer, N. D. Markandu, P. S. Mortimer and G. A. MacGregor (1999). "Structural skin capillary rarefaction in essential hypertension." Hypertension **33**(4): 998-1001.
- Bernthal, T. (1938). "Chemo-reflex control of vascular reactions through the carotid body." Am J Physiol **121**(1): 1-19.
- Bock, P. (1998). "The arterial length-densities under preventive angiotensin-converting-enzyme inhibiting treatment in the myocardium of spontaneously hypertensive rats." Basic Res Cardiol **93**(1): 18-22.
- Boegehold, M. A., M. D. Johnson and H. W. Overbeck (1991). "Pressure-independent arteriolar rarefaction in hypertension." Am J Physiol **261**(1 Pt 2): H83-7.
- Bohlen, H. G. (1986). "Localization of vascular resistance changes during hypertension." Hypertension **8**(3): 181-3.
- Bricca, G., M. Dontenwill, A. Molines, J. Feldman, E. Tibirica, A. Belcourt and P. Bousquet (1989). "Rilmenidine selectivity for imidazoline receptors in human brain." Eur J Pharmacol **163**(2-3): 373-7.
- Bucley JP, F. C. (1981). "Central Nervous System mechanism in hypertension." New York, Raven Press **9**.
- Casale, P. N., R. B. Devereux, M. Milner, G. Zullo, G. A. Harshfield, T. G. Pickering and J. H. Laragh (1986). "Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men." Ann Intern Med **105**(2): 173-8.
- Chillon, J. M. and G. L. Baumbach (1999). "Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a beta-blocker on cerebral arterioles in rats." Hypertension **33**(3): 856-61.
- Chobanian, A. V., G. L. Bakris, H. R. Black, W. C. Cushman, L. A. Green, J. L. Izzo, Jr., D. W. Jones, B. J. Materson, S. Oparil, J. T. Wright, Jr. and E. J. Roccella (2003). "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention,

- Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report." *Jama* **289**(19): 2560-72.
- Chou, T. C., M. H. Yen, C. Y. Li and Y. A. Ding (1998). "Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats." *Hypertension* **31**(2): 643-8.
- Ciuffetti, G., G. Schillaci, S. Innocente, R. Lombardini, L. Pasqualini, S. Notaristefano and E. Mannarino (2003). "Capillary rarefaction and abnormal cardiovascular reactivity in hypertension." *J Hypertens* **21**(12): 2297-303.
- Dahlof, B., P. S. Sever, N. R. Poulter, H. Wedel, D. G. Beevers, M. Caulfield, R. Collins, S. E. Kjeldsen, A. Kristinsson, G. T. McInnes, J. Mehlsen, M. Nieminen, E. O'Brien and J. Ostergren (2005). "Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial." *Lancet* **366**(9489): 895-906.
- Dampney, R. A., M. J. Coleman, M. A. Fontes, Y. Hirooka, J. Horiuchi, Y. W. Li, J. W. Polson, P. D. Potts and T. Tagawa (2002). "Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**(4): 261-8.
- De Luca, N., R. Izzo, D. Fontana, G. Iovino, L. Argenziano, C. Vecchione and B. Trimarco (2000). "Haemodynamic and metabolic effects of rilmenidine in hypertensive patients with metabolic syndrome X. A double-blind parallel study versus amlodipine." *J Hypertens* **18**(10): 1515-22.
- Debbabi, H., L. Uzan, J. J. Mourad, M. Safar, B. I. Levy and E. Tibirica (2006). "Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients." *Am J Hypertens* **19**(5): 477-83.
- Ebinc, H., Z. N. Ozkurt, F. A. Ebinc, D. Ucardag, O. Caglayan and M. Yilmaz (2008). "Effects of sympatholytic therapy with moxonidine on serum adiponectin levels in hypertensive women." *J Int Med Res* **36**(1): 80-7.
- Engelmann, G. L., J. C. Vitullo and R. G. Gerrity (1987). "Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation, and senescence in spontaneously hypertensive rats." *Circ Res* **60**(4): 487-94.
- Esler, M. (2000). "The sympathetic system and hypertension." *Am J Hypertens* **13**(6 Pt 2): 99S-105S.
- Estato, V., C. V. Araujo, P. Bousquet and E. Tibirica (2004). "Effects of centrally acting antihypertensive drugs on the microcirculation of spontaneously hypertensive rats." *Braz J Med Biol Res* **37**(10): 1541-9.
- Feihl, F., L. Liaudet, B. Waeber and B. I. Levy (2006). "Hypertension: a disease of the microcirculation?" *Hypertension* **48**(6): 1012-7.
- Folkow, B. (1982). "Physiological aspects of primary hypertension." *Physiol Rev* **62**(2): 347-504.
- Fulgenzi, G., L. Graciotti, M. G. Collis and O. Hudlicka (1998). "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 **16**(1): 71-7.
- Gasser, P. and F. R. Buhler (1992). "Nailfold microcirculation in normotensive and essential hypertensive subjects, as assessed by video-microscopy." J Hypertens **10**(1): 83-6.
- Gohlke, P., I. Kuwer, A. Schnell, K. Amann, G. Mall and T. Unger (1997). "Blockade of bradykinin B2 receptors prevents the increase in capillary density induced by chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Hypertension **29**(1 Pt 2): 478-82.
- Gonzales C, A. L., Obeso A, Rigual and R. (1994). "Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges." Physiol Rev. **74**(4): 829-98.
- Gundersen, H. J. and E. B. Jensen (1985). "Stereological estimation of the volume-weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections." J Microsc **138**(Pt 2): 127-42.
- Guyton AC, H. J. (2005). "Guyton & Hall: Textbook of Medical Physiology." In. The Circulation. Elsevier Health Medicine ed.
- Haack, D. W., J. J. Schaffer and J. G. Simpson (1980). "Comparisons of cutaneous microvessels from spontaneously hypertensive, normotensive Wistar-Kyoto, and normal Wistar rats." Proc Soc Exp Biol Med **164**(4): 453-8.
- Hansen-Smith, F. M., L. Watson, D. Y. Lu and I. Goldstein (1988). "Griffonia simplicifolia I: fluorescent tracer for microcirculatory vessels in nonperfused thin muscles and sectioned muscle." Microvasc Res **36**(3): 199-215.
- Hardman, J. G. and L. E. Limbird (2007). Goodman & Gilman: as Bases Farmacológicas da Terapêutica
- Harper, R. N., M. A. Moore, M. C. Marr, L. E. Watts and P. M. Hutchins (1978). "Arteriolar rarefaction in the conjunctiva of human essential hypertensives." Microvasc Res **16**(3): 369-72.
- Hasan, K. M., I. T. Manyonda, F. S. Ng, D. R. Singer and T. F. Antonios (2002). "Skin capillary density changes in normal pregnancy and pre-eclampsia." J Hypertens **20**(12): 2439-43.
- Henrich, H. A., W. Romen, W. Heimgartner, E. Hartung and F. Baumer (1988). "Capillary rarefaction characteristic of the skeletal muscle of hypertensive patients." Klin Wochenschr **66**(2): 54-60.
- Heymans C, B. J. (1930). "Sinus carotidien et réflexes respiratoires." C R Soc Biol. **103**: 498-500.
- Hipertensão, S. B. (2006). "V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial." Pan American Journal of Public Health.
- Hoffman, B. B. (2007). Goodman & Gilman: as Bases Farmacológicas da Terapêutica
- Hu, W. Y., D. G. Chen, S. C. Chen, X. Q. Jin and H. J. Wang (1996). "Effect of chronic captopril treatment on circulating and tissue renin-angiotensin system in SHR rats." Zhongguo Yao Li Xue Bao **17**(6): 507-12.
- Iriuchijima, J., S. Mizogami and H. Sokabe (1975). "Sympathetic nervous activity in renal and DOC hypertensive rats." Jpn Heart J **16**(1): 36-43.

- Jin, X. Q., D. G. Chen, S. Zhang and H. J. Wang (1994). "Effects of captopril and clonidine on resting and stress cardiac performance of left ventricle in spontaneously hypertensive rats." Zhongguo Yao Li Xue Bao **15**(6): 501-6.
- Judy, W. V., A. M. Watanabe, D. P. Henry, H. R. Besch, Jr., W. R. Murphy and G. M. Hockel (1976). "Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat." Circ Res **38**(6 Suppl 2): 21-9.
- Julius, S. and S. Majahalme (2000). "The changing face of sympathetic overactivity in hypertension." Ann Med **32**(5): 365-70.
- Kaplan, N. M. and J. T. Flynn (2006). Primary Hypertension: Pathogenesis In. Kaplan's clinical hypertension. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Kleine, P., E. Meissner, V. von Bruchhausen and S. Bruckner (1987). "Effects of clonidine and nifedipine on left ventricular hypertrophy and muscle mass in hypertensive patients." J Cardiovasc Pharmacol **10** Suppl 12: S180-6.
- Koldas, L., F. Ayan and B. Ikitimur (2003). "Short-term effects of rilmenidine on left ventricular hypertrophy and systolic and diastolic function in patients with essential hypertension: comparison with an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium antagonist." Jpn Heart J **44**(5): 693-704.
- Koren, M. J., R. B. Devereux, P. N. Casale, D. D. Savage and J. H. Laragh (1991). "Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension." Ann Intern Med **114**(5): 345-52.
- Korner, P. I. (2007). The Peripheral Vascular Integrator In. Essential hypertension and its causes : neural and non-neural mechanisms. Oxford, Oxford University Press:160.
- le Noble, J. L., G. J. Tangelder, D. W. Slaaf, H. van Essen, R. S. Reneman and H. A. Struyker-Boudier (1990). "A functional morphometric study of the cremaster muscle microcirculation in young spontaneously hypertensive rats." J Hypertens **8**(8): 741-8.
- Levy, B. I., G. Ambrosio, A. R. Pries and H. A. Struijker-Boudier (2001). "Microcirculation in hypertension: a new target for treatment?" Circulation **104**(6): 735-40.
- Levy, B. I., J. B. Michel, J. L. Salzmann, M. Azizi, P. Poitevin, M. Safar and J. P. Camilleri (1988). "Effects of chronic inhibition of converting enzyme on mechanical and structural properties of arteries in rat renovascular hypertension." Circ Res **63**(1): 227-39.
- Levy, B. I., E. L. Schiffrin, J. J. Mourad, D. Agostini, E. Vicaut, M. E. Safar and H. A. Struijker-Boudier (2008). "Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus." Circulation **118**(9): 968-76.
- Levy, D., R. J. Garrison, D. D. Savage, W. B. Kannel and W. P. Castelli (1990). "Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study." N Engl J Med **322**(22): 1561-6.
- Lewington, S., R. Clarke, N. Qizilbash, R. Peto and R. Collins (2002). "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 **360**(9349): 1903-13.

- Lorell, B. H. and B. A. Carabello (2000). "Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis." Circulation **102**(4): 470-9.
- Lundin, S., S. E. Ricksten and P. Thoren (1984). "Renal sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats and normotensive controls, as studied by three different methods." Acta Physiol Scand **120**(2): 265-72.
- Marcus, M. L., D. G. Harrison, W. M. Chilian, S. Koyanagi, T. Inou, R. J. Tomanek, J. B. Martins, C. L. Eastham and L. F. Hiratzka (1987). "Alterations in the coronary circulation in hypertrophied ventricles." Circulation **75**(1 Pt 2): 119-25.
- Mattfeldt, T., G. Mall, H. Gharehbaghi and P. Moller (1990). "Estimation of surface area and length with the orientator." J Microsc **159**(Pt 3): 301-17.
- Melo, R. M., E. Martinho, Jr. and L. C. Michelini (2003). "Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles." Hypertension **42**(4): 851-7.
- Mulvany, M. J. (1993). "Resistance vessel structure and the pathogenesis of hypertension." J Hypertens Suppl **11**(5): S7-12.
- Muxfeldt, E. S., R. Nogueira Ada, G. F. Salles and K. V. Bloch (2004). "Demographic and clinical characteristics of hypertensive patients in the internal medicine outpatient clinic of a university hospital in Rio de Janeiro." Sao Paulo Med J **122**(3): 87-93.
- Noon, J. P., B. R. Walker, D. J. Webb, A. C. Shore, D. W. Holton, H. V. Edwards and G. C. Watt (1997). "Impaired microvascular dilatation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure." J Clin Invest **99**(8): 1873-9.
- Nowak, L., M. Adamczak and A. Wiecek (2005). "Blockade of sympathetic nervous system activity by rilmenidine increases plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension." Am J Hypertens **18**(11): 1470-5.
- Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." Jpn Circ J **27**: 282-93.
- Ollivier, J. P. and M. O. Christen (1994). "I1-imidazoline-receptor agonists in the treatment of hypertension: an appraisal of clinical experience." J Cardiovasc Pharmacol **24** Suppl 1: S39-48.
- Olsen, M. H., E. Fossum, A. Hoieggen, K. Wachtell, E. Hjerkin, S. D. Nesbitt, U. B. Andersen, R. A. Phillips, C. L. Gaboury, H. Ibsen, S. E. Kjeldsen and S. Julius (2005). "Long-term treatment with losartan versus atenolol improves insulin sensitivity in hypertension: ICARUS, a LIFE substudy." J Hypertens **23**(4): 891-8.
- Paquette, P. A., D. Duguay, R. El-Ayoubi, A. Menaouar, B. Danalache, J. Gutkowska, D. DeBlois and S. Mukaddam-Daher (2008). "Control of left ventricular mass by moxonidine involves reduced DNA synthesis and enhanced DNA fragmentation." Br J Pharmacol **153**(3): 459-67.
- Paravicini, T. M. and R. M. Touyz (2006). "Redox signaling in hypertension." Cardiovasc Res **71**(2): 247-58.

- Pollman, M. J., J. L. Hall, M. J. Mann, L. Zhang and G. H. Gibbons (1998). "Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease." Nat Med **4**(2): 222-7.
- Prewitt, R. L., Chen, H and R. Dowell (1982). "Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat." Am J Physiol **243**(2): H243-51.
- Pyorala, K., E. Savolainen, S. Kaukola and J. Haapakoski (1985). "Plasma insulin as coronary heart disease risk factor: relationship to other risk factors and predictive value during 9 1/2-year follow-up of the Helsinki Policemen Study population." Acta Med Scand Suppl **701**: 38-52.
- Rakusan, K., P. W. Hrdina, Z. Turek, E. G. Lakatta, H. A. Spurgeon and G. D. Wolford (1984). "Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: quantitative study." Basic Res Cardiol **79**(4): 389-95.
- R.G. IJzerman, R. T. de Jongh, M. A. Beijik, M. M. van Weissenbruch, H. A. Delemarre-van de Waal, E. H. Serne and C. D. Stehouwer (2003). "Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin." Eur J Clin Invest **33**(7): 536-42.
- Ritter, O., S. Hack, K. Schuh, N. Rothlein, A. Perrot, K. J. Osterziel, H. D. Schulte and L. Neyses (2002). "Calcineurin in human heart hypertrophy." Circulation **105**(19): 2265-9.
- Rizzoni, D., M. Castellano, E. Porteri, G. Bettoni, M. L. Muiesan and E. Agabiti-Rosei (1994). "Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR." Am J Hypertens **7**(2): 193-200.
- Sabino, B., M. A. Lessa, A. R. Nascimento, C. A. Rodrigues, M. G. Henriques, L. R. Garzoni, B. I. Levy and E. Tibirica (2008). "Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis." J Cardiovasc Pharmacol **51**(4): 402-9.
- Sadowski, Z., H. Szwed, A. Kuch-Wocial, A. Kubasik, W. Januszewicz, B. Krupa-Wojciechowska, G. Polak, M. Stejfa, I. Dvorak, I. Balazovjeh, G. Dubai and K. Simon (1998). "Regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients after 1 year of treatment with rilmenidine: a double-blind, randomized, controlled (versus nifedipine) study." J Hypertens Suppl **16**(3): S55-62.
- Scheidegger, K. J., J. M. Wood, H. van Essen and H. A. Struijker-Boudier (1996). "Effects of prolonged blockade of the renin angiotensin system on striated muscle microcirculation of spontaneously hypertensive rats." J Pharmacol Exp Ther **278**(3): 1276-81.
- Scherle, W. (1970). "A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology." Mikroskopie **26**(1): 57-60.
- Schiffrin, E. L., L. Y. Deng and P. Larochelle (1994). "Effects of a beta-blocker or a converting enzyme inhibitor on resistance arteries in essential hypertension." Hypertension **23**(1): 83-91.
- Schmid-Schonbein, G. W., B. W. Zweifach, F. A. DeLano and P. C. Chen (1987). "Microvascular tone in a skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats." Hypertension **9**(2): 164-71.

- Schunkert, H., H. W. Hense, S. R. Holmer, M. Stender, S. Perz, U. Keil, B. H. Lorell and G. A. Riegger (1994). "Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy." N Engl J Med **330**(23): 1634-8.
- Serne, E. H., R. O. Gans, J. C. ter Maaten, G. J. Tangelder, A. J. Donker and C. D. Stehouwer (2001). "Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction." Hypertension **38**(2): 238-42.
- Silvestre, J. S., S. Bergaya, R. Tamarat, M. Duriez, C. M. Boulanger and B. I. Levy (2001). "Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway." Circ Res **89**(8): 678-83.
- Silvestre, J. S. and B. I. Levy (2000). "[Hypertension: microvascular complications]." Arch Mal Coeur Vaiss **93**(11 Suppl): 1387-92.
- Skyschally, A., R. Erbel and G. Heusch (2003). "Coronary microembolization." Circ J **67**(4): 279-86.
- Smith, S., S. Julius, K. Jamerson, J. Amerena and N. Schork (1994). "Hematocrit levels and physiologic factors in relationship to cardiovascular risk in Tecumseh, Michigan." J Hypertens **12**(4): 455-62.
- Struijker Boudier, H. A., J. L. le Noble, M. W. Messing, M. S. Huijberts, F. A. le Noble and H. van Essen (1992). "The microcirculation and hypertension." J Hypertens Suppl **10**(7): S147-56.
- SUS (2005). Banco de dados sobre a saúde no Brasil. DATASUS em <http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php?area=0204&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?hiperdia/cnv/hd> acessado no dia 20 de Junho de 2009
- Szabo, B. (2002). "Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action." Pharmacol Ther **93**(1): 1-35.
- Thybo, N. K., N. Stephens, A. Cooper, C. Aalkjaer, A. M. Heagerty and M. J. Mulvany (1995). "Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension." Hypertension **25**(4 Pt 1): 474-81.
- Tibiriçá, E. (2001). Fisiopatologia em Medicina Cardiovascular. Rio de Janeiro, Revinter.
- Tibirica, E., J. Feldman, C. Mermet, L. Monassier, F. Gonon and P. Bousquet (1991). "Selectivity of rilmenidine for the nucleus reticularis lateralis, a ventrolateral medullary structure containing imidazoline-preferring receptors." Eur J Pharmacol **209**(3): 213-21.
- Tibirica, E., C. Mermet, J. Feldman, F. Gonon and P. Bousquet (1989). "Correlation between the inhibitory effect on catecholaminergic ventrolateral medullary neurons and the hypotension evoked by clonidine: a voltammetric approach." J Pharmacol Exp Ther **250**(2): 642-7.
- Timio, M., S. Venanzi, S. Gentili, M. Ronconi, G. Del Re and M. Del Vita (1987). "Reversal of left ventricular hypertrophy after one-year treatment with clonidine: relationship between echocardiographic findings, blood pressure, and urinary catecholamines." J Cardiovasc Pharmacol **10** Suppl 12: S142-6.

- Tornig, J., K. Amann, E. Ritz, C. Nichols, M. Zeier and G. Mall (1996). "Arteriolar wall thickening, capillary rarefaction and interstitial fibrosis in the heart of rats with renal failure: the effects of ramipril, nifedipine and moxonidine." J Am Soc Nephrol **7**(5): 667-75.
- Trippodo, N. C. and E. D. Frohlich (1981). "Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat." Circ Res **48**(3): 309-19.
- Van Kerckhoven, R., R. van Veghel, P. R. Saxena and R. G. Schoemaker (2004). "Pharmacological therapy can increase capillary density in post-infarction remodeled rat hearts." Cardiovasc Res **61**(3): 620-9.
- Van Zwieten, P. A. and S. L. Peters (1999). "Central I1-imidazoline receptors as targets of centrally acting antihypertensive drugs. Clinical pharmacology of moxonidine and rilmenidine." Ann N Y Acad Sci **881**: 420-9.
- van Zwieten, P. A., M. J. Thoolen and P. B. Timmermans (1984). "The hypotensive activity and side effects of methyldopa, clonidine, and guanfacine." Hypertension **6**(5 Pt 2): II28-33.
- Vicaut, E. (1999). "Microcirculation and arterial hypertension." Drugs **59 Spec No**: 1-10.
- Vogt, M., W. Motz, B. Schwartzkopff and B. E. Strauer (1990). "Coronary microangiopathy and cardiac hypertrophy." Eur Heart J **11 Suppl B**: 133-8.
- Whitworth, J. A. (2003). "2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension." J Hypertens **21**(11): 1983-92.
- Zhang, B., N. Shono, P. Fan, S. Ando, H. Xu, S. Jimi, S. Miura, K. Kumagai, K. M. Win, A. Matsunaga, H. Iwasaki and K. Saku (2005). "Histochemical characteristics of soleus muscle in angiotensin-converting enzyme gene knockout mice." Hypertens Res **28**(8): 681-8.
- Zhang, L., D. G. Edwards and K. H. Berecek (1996). "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 **18**(2): 201-26.
- Zhou, A., S. Egginton, O. Hudlicka and M. D. Brown (1998). "Internal division of capillaries in rat skeletal muscle in response to chronic vasodilator treatment with alpha1-antagonist prazosin." Cell Tissue Res **293**(2): 293-303.

## **8. ANEXOS**

### **8.1. Artigo Publicado em Abril de 2008**

Título: Effects of Antihypertensive Drugs on Capillary Rarefaction In Spontaneously Hypertensive Rats: Intravital Microscopy and Histologic Analysis.

**8.2. Artigo submetido em 20 de Março de 2009**

Título: Microvascular effects of centrally acting-antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)