UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CAMILA DE ASSIS FLEURY

**Avaliação dos efeitos vasculares e expressão de mRNA de
receptores de drogas vasoconstritoras em leito arterial mesentérico
de ratos normotensos, diabéticos, hipertensos renais um-rim, um
clip (1R-1C) e 1R-1Cdiabéticos**

BAURU
2016

CAMILA DE ASSIS FLEURY

Avaliação dos efeitos vasculares e expressão de mRNA de receptores de drogas vasoconstritoras em leito arterial mesentérico de ratos normotensos, diabéticos, hipertensos renais um-rim, um clip (1R-1C) e 1R-1C diabéticos

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Odontologia

Área de concentração: Biologia Oral
Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria

Versão corrigida

BAURU
2016

An25e Fleury, Camila de Assis
Avaliação dos efeitos vasculares e expressão
de mRNA de receptores de drogas
vasoconstritoras em leito arterial mesentérico de
ratos normotensos, diabéticos, hipertensos renais
um-rim, um clip (1R-1C) e 1R-1C diabéticos –
Bauru, 2016.
138p. : 43il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso
de Faria

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética de Pesquisa em Animais da FOB-USP
Protocolo nº: 021/2012
Data: 29/08/2013

(Cole aqui sua folha de aprovação)

DEDICATÓRIA

“Ao meu filho e meu marido, razões de todo meu esforço. À minha família, em especial aos meus pais, pela base da minha educação, pelo exemplo e apoio que sempre recebi. Aos meus sogros por todo suporte e carinho.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me acompanharam nesta jornada, peço desculpas se esquecer de mencionar alguém.

Primeiramente a Deus, que é o princípio de tudo e permitiu que eu realizasse este trabalho.

Aos professores do curso de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Bauru, que demonstram em suas aulas a importância da pesquisa científica.

Ao departamento de Farmacologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, cujo trabalho em equipe e o companheirismo sempre nos inspiram a aprender e fazer o melhor possível. Em especial ao meu coorientador, Prof. Carlos Ferreira dos Santos, por me “adotar” e sempre estar disposto a ensinar (“até às 18h da sexta-feira”). Aos funcionários Viviane, Elza Araújo Torres e principalmente Thiago José Dionísio, sempre presente para auxiliar nos experimentos ou em dúvidas sobre a pesquisa.

Aos meus colegas de curso e de laboratório com quem convivi durante estes anos, obrigada pelo companheirismo. Em especial agradeço a Gabriela Moraes Oliveira pela amizade, companheirismo e por assumir parte dos experimentos para me auxiliar sempre que necessário. Obrigada a Clarissa Herculani, Danielle Souza e André Pinhata pela ajuda com os experimentos.

Obrigada à minha família, meus sogros que cuidaram do Joaquim e meu marido que sempre esteve ao meu lado garantindo que tivesse tranquilidade para trabalhar. Agradeço ao meu irmão Fábio Fleury e minha amiga Paula Tatemotoa revisão do texto.

Nossos agradecimentos, também, à DentsplayPharmaceutical, setor industrial de Catanduva – SP, que através do Dr. Pedro Clapis Lomba nos cedeu matéria – prima para realização dos experimentos.

Finalmente, agradeço a oportunidade que me foi dada e confiança que recebi do meu professor orientador, Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria. Além de amigo, vejo seu exemplo de dedicação aos alunos e à faculdade como modelo que seguirei por toda a vida. Obrigada pela paciência e perdoe algum contratempo que tenha acidentalmente causado.

“A persistência é o menor caminho para o êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a reatividade vascular de agentes vasoconstritores presentes nas soluções anestésicas locais (Adrenalina - vasoconstrição e vasodilatação; Felipressina - vasoconstrição), nas doses de 80, 160, 320, 640 e 1280ng (adrenalina) ou 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 $\times 10^{-3}$ UI (felipressina), em leito arterial mesentérico de ratos normotensos, diabéticos, hipertensos renais um-rim, um-clip (1R-1C) e hipertensos 1R-1C-diabéticos. E correlacionar tal reatividade com expressão de RNA dos receptores α_{1A} e β_2 -adrenérgicos, V_{1A} para vasopressina e AT_{1A} , AT_{1B} e AT_2 para angiotensina II visando verificar se a hipertensão arterial e o diabetes mellitus provocam alteração em modelo indutivo e isogênico. Ratos Wistar pesando 110-160g, foram anestesiados com mistura de quetamina e xilazina (50+10mg/ml/kg de peso), tiveram seu abdômen aberto e receberam um “clip” de prata com abertura 0,25mm na artéria renal esquerda, removendo-se cirurgicamente o rim direito (ratos 1R-1C). Após 14 dias, receberam injeção subcutânea de estreptozotocina (50 e 60mg/kg de peso) para indução do *diabetes mellitus* sendo a glicemia testada pela veia caudal previamente aos experimentos (diabéticos). Após 30-42 dias da implantação do “clip”, todos os grupos foram novamente anestesiados e implantou-se cânula de polietileno (PE-50) na artéria carótida esquerda para registro direto da pressão arterial. Após registro da pressão os animais tiveram a artéria principal mesentérica exposta e canulada. O leito arterial mesentérico foi então isolado e colocado em banho com solução nutritiva de Krebs a 37°C. O cateter foi conectado ao sistema de registro computadorizado (PowerLab®) utilizando software específico (Chart 5Pro®). Analisaram-se: a pressão máxima (vasoconstrição) e mínima (vasodilatação), o tempo necessário para atingir esse valor, duração total da resposta, integral e integral sobre a linha de base. Os dados foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), seguida do teste de Holm-Sidak (distribuição normal) ou de Mann-Whitney (não paramétrico), quando apropriado, nível de significância de 5%. Todas as respostas máximas de vasoconstrição apresentaram comportamento dose-dependente, contudo, para os quatro grupos estudados, a resposta vasoconstritora para adrenalina foi significativamente superior à felipressina ($p < 0,05$). Diabetes e hipertensão reduziram a resposta vasoconstritora da adrenalina

e da felipressina, valores de integral sobre a linha de base, respectivamente para grupo controle, diabético, hipertenso e hipertenso-diabético: 2462 ± 465 ; 1511 ± 236 ; 2542 ± 5456 e 3749 ± 819 mmHg.s ($p < 0,05$) para adrenalina e 3749 ± 708 ; 746 ± 103 ; 1647 ± 422 ; 1359 ± 591 mmHg.s ($p < 0,05$) para felipressina. Tanto o diabetes quanto a hipertensão, associadas ou não, aumentaram significativamente o tempo para atingir a pressão máxima de vasoconstrição e a duração ($p < 0,05$). As artérias mesentéricas de ratos diabéticos, hipertensos e diabéticos-hipertensos apresentaram expressão significativamente aumentada dos receptores α_{1A} -adrenérgico, AT_{1B} e AT_2 para angiotensina II ($p < 0,05$), enquanto receptor AT_{1A} estava com a expressão aumentada apenas nos grupos diabéticos. A expressão do receptor α_{1A} -adrenérgico é discrepante com os achados funcionais, o que pode ser justificado pela fase crônica da doença em que a PCR foi realizada. É possível correlacionar os dados obtidos com a menor atividade vasoconstritora da felipressina observada clinicamente. A maior sensibilidade às moléculas vasoconstritoras pode explicar a maior tendência de pacientes diabéticos desenvolverem hipertensão. A partir dos dados obtidos pode-se concluir que a adrenalina é o vasoconstritor mais potente que a felipressina e ambas as moléculas tem seus efeitos reduzidos em pacientes hipertensos e diabéticos, o que reforça a indicação de se utilizar anestésicos locais associados a vasoconstritores nestas populações.

Palavras-chave: felipressina, adrenalina, hipertensão arterial, *diabetes mellitus*.

ABSTRACT

Vascular reactivity and vasoconstrictor drugs receptors RNA expression on mesenteric artery bed of normotensive, diabetic, 1K-1C hypertensive and 1K-1C hypertensive-diabetic rats.

The main goal of this study was to evaluate and compare vasoconstrictor agents present in local anesthetic solutions (Epinephrine - vasoconstriction and vasodilation, Felypressin - vasoconstriction) vascular reactivity on mesenteric artery bed of normotensive, diabetic, renal hypertensive one-kidney-one-clip (1K1C) and hypertensive 1K1C diabetic rats. Dosages studied were 80, 160, 320, 640 and 1280ng (epinephrine) or 0,25; 0,5; 1; 2 and 4×10^{-3} UI (felypressin). Also, we aimed to correlate artery response with RNA expression of α_{1A} and β_2 -adrenoceptors, V_{1A} vasopressin receptor and AT_{1A} , AT_{1B} e AT_2 angiotensin receptors, in order to verify if arterial hypertension and diabetes can lead to alterations on an inductive and isogenic model. Wistar male rats weighing 110-160g were anaesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (50+10mg/ml/kg), had their abdominal cavity opened and a silver "clip" with 0.25-mm gap was implanted in the main left kidney artery, the right kidney was surgically removed (1K1C-rats). After 14 days, they received a subcutaneous injection of streptozotocin (50 and 60 mg/ml/kg) for inducing diabetes, whereas the glycemia was tested via the tail vein prior to surgery (diabetic rats). Around 30-42 after the "clip" was implanted, all the groups were anaesthetized again and a polyethylene (PE-50) cannula was implanted on the left carotid artery for direct arterial pressure register. After registering the pressure, the animals had their main mesenteric artery exposed and cannulated. The mesenteric artery bed was then isolated and transferred to a bath with Krebs nutritive solution at 37°C. The catheter was connected to the computer register system (PowerLab®) using a specific software (Chart 5Pro ®). The following parameters were analyzed: maximum (vasoconstriction) and minimal pressure (vasodilating), the amount of time necessary to achieve this number, total duration of the reaction, integral and integral over baseline. The data was submitted to analysis of variance of repeated measures (ANOVA), followed by a Holm-Sidak (normal distribution) test or Mann Whitney

(parametrics) test when suitable, with a significance level of 5%. All maximum vasoconstriction results presented dosage-dependant behavior, however, for the four groups tested, the vasoconstrictive result for epinephrine was significantly superior to felypressin ($p < 0,05$). Diabetes and hypertension significantly reduced epinephrine and felypressin vasoconstrictor responses, integral above baseline, respectively, for control, diabetic, hypertensive and hypertensive-diabetic groups: 2462 ± 465 ; 1511 ± 236 ; 2542 ± 5456 e 3749 ± 819 mmHg.s ($p < 0.05$, epinephrine) and 3749 ± 708 ; 746 ± 103 ; 1647 ± 422 ; 1359 ± 591 mmHg.s ($p < 0.05$, felypressin). Both diabetes and hypertension, associated or not, significantly increased time necessary to achieve maximum vasoconstrictor response and its duration ($p < 0,05$). Diabetic, hypertensive and hypertensive-diabetic mesenteric arteries presented α_{1A} -adrenoceptor, AT_{1B} and AT_2 angiotensin II-receptor gene expression significantly increased when compared with control group ($p < 0,05$), while AT_{1A} receptor presented this pattern only in diabetic groups. α_{1A} -adrenoceptor gene expression did not confirm functional data, probably due to chronic disease state in which PCR was performed. A partir dos dados obtidos pode-se concluir que a adrenalina é o vasoconstritor mais potente que a felipressina e ambas as moléculas tem seus efeitos reduzidos em ratos hipertensos e diabéticos não tratados, o que reforça a indicação de se utilizar anestésicos locais associados a vasoconstritores nestas populações. It's possible to correlate our data with reduced vasoconstrictor activity of felypressin in clinical use. Increased sensibility and receptor population for vasoconstrictor endogenous molecules could explain diabetic population's tendency to develop arterial hypertension. Our results suggest that epinephrine is more potent than felypressin and both vasoconstrictors presents reduced effects on diabetic and hypertensive patients, what reinforces vasoconstrictor associated with local anesthetic use in this population.

Key words: Felypressin, Epinephrine, Hypertension, *Diabetes Mellitus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 Fluxograma dos procedimentos realizados nos grupos experimentais 50
- Figura 2 Exemplo de leito arterial mesentérico logo após ser canulado e removido da cavidade abdominal (A) e após remoção dos órgãos irrigados por ele em jaqueta de vidro com banho a 37°C e perfundido em solução nutritiva de Krebs modificada (B). Sistema de perfusão da solução nutritiva de Krebs modificada com serpentina e jaqueta de vidro com banho a 37°C acoplado a sistema de medida de pressão: transdutor ligado ao sistema PowerLab 4/30 (C). 50
- Figura 3 Exemplo de registro de reatividade vascular em leito arterial mesentérico de rato **normotenso**. As alterações de pressão observadas são decorrentes de vasoconstrição provocada por diferentes doses de **adrenalina**. Escala do eixo vertical em mmHg. Escala do eixo horizontal em minutos. 57
- Figura 4 Exemplo de registro de reatividade vascular em leito arterial mesentérico de rato **normotenso**. As alterações de pressão observadas são decorrentes de vasoconstrição provocada por diferentes doses de **felipressina**. Escala do eixo vertical em mmHg. Escala do eixo horizontal em minutos. 57
- Figura 5 Exemplo de registro de reatividade vascular em leito arterial mesentérico de rato **normotenso**. As alterações de pressão observadas são decorrentes de vasodilatação provocada por diferentes doses de **adrenalina**. Escala do eixo vertical em mmHg. Escala do eixo horizontal em minutos. 58
- Figura 6 Pressão Arterial Média, Sistólica e Diastólica (basal) registradas por pressão arterial direta em animais **normotensos**, **diabéticos**, **hipertensos 1R-1C** e **hipertensos 1R-1C-diabéticos**. Média $\pm$ epm (erro padrão da média). *p<0,05 em comparação com normotensos e diabéticos. 59

Figura 7	Frequência Cardíaca registrada por pressão arterial direta em animais normotensos, diabéticos, hipertensos 1R-1C e hipertensos 1R-1C-diabéticos . Média $\pm$ epm (erro padrão da média).	60
Figura 8	Peso registrado antes dos procedimentos cirúrgicos em animais normotensos, diabéticos, hipertensos 1R-1C e hipertensos 1R-1C-diabéticos . Média $\pm$ epm (erro padrão da média). *p<0,05 em comparação com normotensos e diabéticos.	61
Figura 9	Glicemia medida por sangue caudal com os animais normotensos, diabéticos, hipertensos 1R-1C e hipertensos 1R-1C-diabéticos acordados anteriormente aos experimentos. Média $\pm$ epm (erro padrão da média). *p<0,05 comparado aos normotensos e hipertensos.	61
Figura 10	Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. *p<0,05	62
Figura 11	Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.	63
Figura 12	Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstrição após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * p<0,05	64
Figura 13	Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstrição após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.	65

Figura 14	Duração da resposta vasoconstritora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$	66
Figura 15	Duração da resposta vasoconstritora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$	67
Figura 16	Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$	68
Figura 17	Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$	69
Figura 18	Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$	70
Figura 19	Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$	71
Figura 20	Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição à felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$	72
Figura 21	Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição à felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.	73

Figura 22	Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstricção após exposição à felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	74
Figura 23	Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstricção após exposição à felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.	75
Figura 24	Duração da resposta vasoconstritora para felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	76
Figura 25	Duração da resposta vasoconstritora para felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	77
Figura 26	Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	78
Figura 27	Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	79
Figura 28	Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	80
Figura 29	Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	81

Figura 30	Curva dose-resposta de diferença pressão mínima causada por vasodilatação após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	82
Figura 31	Curva dose-resposta de diferença pressão mínima causada por vasodilatação após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.	83
Figura 32	Tempo para redução máxima de pressão causado por vasodilatação após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	84
Figura 33	Tempo para redução máxima de pressão causado por vasodilatação após exposição à adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm	85
Figura 34	Duração da resposta vasodilatadora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	86
Figura 35	Duração da resposta vasodilatadora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	87
Figura 36	Integral (área sob a curva) da resposta vasodilatadora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$	88

Figura 37	Integral (área sob a curva) da resposta vasodilatadora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. *p<0,05	89
Figura 38	Integral sobre linha de base da resposta vasodilatadora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * p<0,05	90
Figura 39	Integral sobre linha de base da resposta vasodilatadora para adrenalina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. *p<0,05	91
Figura 40	Comparação das curvas dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição à adrenalina e felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. *p<0,05	92
Figura 41	Comparação da duração das respostas vasoconstritoras para adrenalina e felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. *p<0,05	93
Figura 42	Comparação da integral (área sob a curva) das respostas vasoconstritoras para adrenalina e felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * p<0,05	94
Figura 43	Comparação da integral sobre linha de base das respostas vasoconstritoras para adrenalina e felipressina em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * p<0,05	95

Figura 44	Quantificação relativa para RNAm de receptor α_{1A} -adrenérgico em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * $p < 0,05$	96
Figura 45	Quantificação relativa para RNAm de receptor β_2 -adrenérgico em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n).	97
Figura 46	Quantificação relativa para RNAm de receptor V_{1A} para vasopressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n).	98
Figura 47	Quantificação relativa para RNAm de receptor AT_{1A} para angiotensina II em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * $p < 0,05$	99
Figura 48	Quantificação relativa para RNAm de receptor AT_{1B} para angiotensina II em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * $p < 0,05$	100
Figura 49	Quantificação relativa para RNAm de receptor AT_2 para angiotensina II em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * $p < 0,05$	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alvo do PCR quantitativo e número de catálogo.

Tabela 2 - Valores basais de: pressão arterial média, sistólica e diastólica, 52 frequência cardíaca, peso e glicemia dos animais ***normotensos***, ***diabéticos***, ***hipertensos 1R-1C*** e ***hipertensos 1R-1C-diabéticos***. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$ em comparação com normotensos. $^{\dagger}p < 0,05$ em comparação com diabéticos. $^{\ddagger}p < 0,05$ em comparação com hipertensos.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

α Alfa

β beta

μ g micrograma

1K-1C One-kidney, one clip

1R-1C um-rim, um clip

ANOVA análise de variância

BP Bloodpressure

bpm batimentos por minuto

ECA enzima conversora de angiotensina

epm erro padrão da média

HR Heart rate

JNC 7Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure

JNC6Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure

kg quilograma

L levógira

Ltda. Limitada

mg miligrama

mLmililitro

mm milímetro

mmHg milímetro de mercúrio

n número de animais empregados

Na⁺ Sódio

ngnanograma

PA pressão arterial

PE-50 polietileno com 0,58mm de diâmetro interno

s segundo

S.A. Sociedade Anônima

SP São Paulo

UI Unidade Internacional

USP Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

- * nível de significância a 5%
- ** nível de significância a 1%

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	29
1.1	<u>Risco do uso de vasoconstritores em pacientes com diabetes mellitus</u>	35
1.2	<u>Risco do uso de vasoconstritores em pacientes com hipertensão arterial</u>	37
2	PROPOSIÇÃO	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1	<u>Animais utilizados</u>	47
3.2	<u>Produção da Hipertensão 1R1C</u>	47
3.3	<u>Indução do Diabetes mellitus</u>	48
3.4	<u>Implantação dos cateteres e registro da Pressão Arterial Direta</u>	49
3.5	<u>Experimentos de Reatividade Vascular em Leito Arterial Mesentérico</u>	49
3.6	<u>Curvas Dose-Resposta</u>	51
3.7	<u>Determinação da Expressão Gênica de Receptores Adrenérgicos, para Vasopressina e do Sistema Renina-Angiotensina</u>	52
3.8	<u>Análise Estatística</u>	53
4	RESULTADOS	55
4.1	<u>Registros dos experimentos</u>	57
4.2	<u>Valores basais</u>	58
4.3	<u>Reatividade Vascular em Leito Arterial Mesentérico</u>	62
4.3.a	<u>Vasoconstrição provocada por adrenalina</u>	62
4.3.a.1	Diferença de pressão máxima por vasoconstrição	62
4.3.a.2	Tempo para pressão máxima por vasoconstrição	64
4.3.a.3	Duração da resposta vasoconstritora	66
4.3.a.4	Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora	68
4.3.a.5	Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora	70
4.3.b	<u>4.3.b) Vasoconstrição provocada por felipressina</u>	72
4.3.b.1	Diferença de pressão máxima por vasoconstrição	72
4.3.b.2	Tempo para pressão máxima por vasoconstrição	74

4.3.b.3	<i>Duração da resposta vasoconstritora</i>	76
4.3.b.4	<i>Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora</i>	78
4.3.b.5	<i>Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora</i>	80
4.3.c	<u><i>Vasodilatação provocada por adrenalina</i></u>	82
4.3.c.1	<i>Diferença de pressão mínima por vasodilatação</i>	82
4.3.c.2	<i>Tempo para pressão mínima por vasodilatação</i>	84
4.3.c.3	<i>Duração da resposta vasodilatadora</i>	86
4.3.c.4	<i>Integral (área sob a curva) da resposta vasodilatadora</i>	88
4.3.c.5	<i>Integral sobre a linha de base da resposta vasodilatadora</i>	90
4.3.d	<u><i>– Comparação entre vasoconstrição provocada por adrenalina e felipressina</i></u>	92
4.3.d.1	<i>Diferença de pressão máxima por vasoconstrição</i>	92
4.3.d.2	<i>Duração da resposta vasoconstritora</i>	93
4.3.d.3	<i>Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora</i>	94
4.3.d.4	<i>Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora</i>	95
4.4	<u><i>Quantificação relativa da expressão gênica de receptores em leito arterial mesentérico</i></u>	96
4.4.a	Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor α_{1A} -adrenérgico	96
4.4.b	Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor β_2 -adrenérgico	97
4.4.c	Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor V_{1A} para vasopressina	98
4.4.d	Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor AT_{1A} para angiotensina II	99
4.4.e	Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor AT_{1B} para angiotensina II	100
4.4.f	Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor AT_2 para angiotensina I	101
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÕES	125
7	REFERÊNCIAS	129

1 Introdução e
Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudos da Dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual atual ou potencial, sendo descrita em termos de lesão tecidual (IASP, 1994a). Apesar de ser um mecanismo de defesa do organismo, em procedimentos cirúrgicos é de extrema necessidade que a mesma seja controlada. Busca-se com a anestesia a supressão da dor, diminuindo inclusive a possibilidade de morte durante os procedimentos mais delicados. Em Odontologia, a presença de dor pode ser a causa da procura pelo profissional, decorrente de doenças ou condições específicas na cavidade oral ou estruturas adjacentes, bem como decorrente do tratamento odontológico, o que faz do cirurgião-dentista um dos profissionais de saúde com maior contato com os sintomas da dor (FARIA et al., 2014).

A nocicepção é definida como o conjunto de processos e vias neurais que transmitem o estímulo nocivo (IASP, 1994b). Os neurônios aferentes da dor (nociceptivos) são caracterizados pelas terminações em “fibras nuas”, pois não apresentam definição morfológica característica. Os receptores da dor, denominados nociceptores, podem responder a estímulos mecânicos, químicos e térmicos (GUYTON, 2006a). As fibras A δ e C, chamadas respectivamente de fibras rápidas e lentas da transmissão da dor, são os axônios de menor diâmetro do sistema nervoso periférico, ou seja, possuem a menor camada de mielina. Estas características da nocicepção aguda serão importantes na ação de anestésicos locais (YANAGIDATE; STRICHARTZ, 2007).

Os nociceptores são os receptores do Sistema Nervoso Central que apresentam menor nível de adaptação, podendo não ocorrer tal fenômeno. Alguns casos de estímulos dolorosos repetitivos levam ao aumento da resposta e expressão de nociceptores, levando a hiperalgesia (dor desproporcional ao estímulo). Apesar de não haver adaptação, existe um sistema do SNC que promove analgesia e explicam a variabilidade intrapessoal de resposta ao mesmo estímulo doloroso (GUYTON, 2006a). É importante ressaltar também que as vias nociceptivas têm uma importante sinalização no tálamo, região do cérebro relacionada às emoções, o que torna a dor uma sensação emocional, portanto individual. No período intraoperatório, a anestesia é essencial para o conforto do paciente, sendo muito utilizada a

anestesia local devido ao curto período de efeito e facilidade de manejo do paciente em ambiente ambulatorial.

Os anestésicos locais bloqueiam a propagação do sinal das fibras nociceptivas próximo ao local onde será realizado o procedimento cirúrgico. Estas moléculas são injetadas próximas ao nervo que se deseja bloquear e difundem atravessando a membrana plasmática dos axônios e ligam-se aos canais de sódio voltagem-dependentes, estabilizando-os na conformação fechada (BALSER, 1998). Devido a essa localização intracelular do sítio de ligação dos anestésicos locais aos canais de sódio, é necessário que os anestésicos locais apresentem lipossolubilidade suficiente para atravessar a membrana plasmática e a bainha de mielina do neurônio nociceptor. Esta solubilidade em lipídeos parece também ser determinante na sua ação preferencial em fibras de baixo calibre, como aquelas envolvidas na nocicepção (RANG et al., 2004a). As fibras A δ e C são pouco mielinizadas, mesmo sendo as fibras A δ responsáveis pela sinalização da dor rápida ainda são as de menor calibre do SNC, o que garante que outros axônios sensoriais, ou mesmo motores, não sejam bloqueados facilmente, quando se infiltra a solução anestésica próxima ao nervo alvo (CATTERALL; MACKIE, 1986).

Os principais grupos de anestésicos são aqueles cuja ligação entre as porções aromática e cadeia lateral amina se dá por ligação éster ou amida, sendo tais grupos denominados, respectivamente, de anestésicos ésteres ou amídicos. O tecido conjuntivo e o plasma sanguíneo dispõem de muitas enzimas esterases inespecíficas; devido a este fato, o tempo de ação dos anestésicos ésteres é menor que o dos anestésicos do tipo amida (RANG et al., 2004a). Isto explica o emprego em maior escala deste último grupo de anestésicos; porém, estas moléculas deverão ser absorvidas pelo sangue para serem biotransformadas, preferencialmente no fígado, exigindo que se distribuam por diferentes tecidos até sua completa metabolização e excreção. Quando aplicados próximo ao nervo com a finalidade de provocar a anestesia, estes fármacos também causam um efeito colateral, vasodilatação, devido ao relaxamento da musculatura lisa, pois apenas a cocaína apresenta ações vasoconstritoras diretas. Somando-se este efeito à sua lipossolubilidade característica, os anestésicos apresentam grande probabilidade de se ligar aos canais de sódio das células excitáveis do Sistema Nervoso Central e do coração (SINGH; LEE, 1998). O próprio mecanismo de ação deste grupo de moléculas define seus efeitos colaterais: bradicardia, arritmias cardíacas,

convulsões, chegando finalmente à parada cardíaca devido ao bloqueio da transmissão dos potenciais de ação nos neurônios centrais e, sobretudo, no sistema de condução cardíaco (COVINO, 1988).

Devido a estas características dos anestésicos locais, passou-se a associar vasoconstritores às soluções anestésicas para garantir maior eficiência e duração da anestesia, diminuição dos efeitos tóxicos dos anestésicos locais e menor perda de sangue durante as cirurgias. Considerando que os anestésicos locais do tipo amida, mais amplamente utilizados, são metabolizados no fígado, devem ser absorvidos para a corrente sanguínea distribuindo-se pelo corpo e atingindo seu local de transformação para serem depois eliminados (WESTFALL; WESTFALL, 2006). Contudo, devido à vasoconstrição, a quantidade de anestésico local que passa para a corrente sanguínea diminui o que possibilita um equilíbrio com a metabolização que mantém a concentração sanguínea de anestésico local abaixo do limite de letalidade anteriormente citado. O controle de dor intraoperatória é reduzido quando se utiliza anestésicos locais sem vasoconstritores associados. Além de contrabalançar o efeito vasodilatador dos anestésicos, os vasoconstritores aumentam o tempo de permanência destas drogas no local de ação, produzindo uma anestesia mais duradoura e profunda (BROWN, 2005).

A maior parte dos vasoconstritores utilizados são agonistas adrenérgicos: adrenalina, noradrenalina, levonoderfrin e fenilefrina. Estas substâncias ligam-se a receptores amplamente distribuídos pelo corpo na sinalização do Sistema Nervoso Autônomo Simpático. Os receptores α_1 -adrenérgicos estão envolvidos principalmente com a vasoconstrição em leitos arteriais de resistência, foram identificadas três subclasses, α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} . Os receptores α_2 -adrenérgicos (subclasses α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) são encontrados principalmente nos neurônios pré-sinápticos regulando a liberação de noradrenalina através de *feedback* negativo. Os receptores β_1 -adrenérgicos estão envolvidos com a sinalização autonômica no coração, aumentando a frequência cardíaca e a força de contração. Os receptores β_2 -adrenérgicos estão relacionados com a vasodilatação principalmente de leitos que irrigam músculos esqueléticos e broncodilatação. Os receptores β_3 -adrenérgicos localizam-se, preferencialmente, em tecido adiposo e regulam lipólise nestas células.

A noradrenalina possui pouca ação vasodilatadora por apresentar menor afinidade pelos receptores β_2 -adrenérgicos, enquanto a adrenalina liga-se aos

receptores α_1 , α_2 , β_1 e β_2 . O levonordefrin (alfa-metilnoradrenalina) é um análogo sintético da noradrenalina, apresentando praticamente os mesmos efeitos que esta última, parecendo agir pela ligação específica com receptores α_1 e α_2 . A fenilefrina é um agonista específico para receptores α_1 , interagindo com esses receptores vasculares e promovendo apenas vasoconstrição (WESTFALL; WESTFALL, 2006).

Uma opção para os agonistas adrenérgicos seriam os derivados sintéticos da vasopressina ou hormônio antidiurético, que agem diretamente em receptores V1 nas células musculares lisas (octapressina ou felipressina). A vasopressina é produzida pela neuro-hipófise e liberado no organismo em situações de aumento de osmolaridade plasmática ou quando de hipovolemia e hipotensão acentuada (JACKSON, 2006). A felipressina, análogo sintético utilizado como vasoconstritor, atua especificamente sobre uma classe de receptores denominada V₁, não exibindo nenhum tipo de interação com os receptores do sistema simpático (CECANHO; DE LUCA; RANALLI, 2006). Em função de não apresentar influência significativa direta sobre o coração e ser capaz de produzir outros efeitos que limitam o aumento da resistência periférica (como a inibição da liberação do neurotransmissor simpático), nas doses habituais apresenta poucos efeitos sobre a frequência cardíaca, pressão arterial ou mesmo sobre o ritmo cardíaco. As limitações sobre o uso de felipressina são a menor disponibilidade de estudos sobre sua segurança e o preço elevado, devido à sua estrutura peptídica. Já os do primeiro grupo (agonistas adrenérgicos) são mais comumente utilizados devido ao menor preço e maior disponibilidade.

Apesar da esperada ação vasoconstritora no local da injeção, foi demonstrado que solução anestésica local contendo adrenalina aumenta a concentração sanguínea de adrenalina e frequência cardíaca em pacientes normais, durante procedimento odontológico, quando comparada à solução contendo felipressina como vasoconstritor (SALONEM et al., 1988). Considerando que os vasoconstritores adrenérgicos possuem grande número de receptores em diversas funções do organismo, alterando principalmente o sistema cardiovascular, gerou-se o receio do uso de vasoconstritores associados a anestésicos locais em pacientes portadores de doenças que afetem esse sistema. Os efeitos das substâncias adrenérgicas na circulação são diversos, sendo principalmente preocupantes as ações cardiovasculares e alterações metabólicas como hiperglicemia e hipocalcemia (RANG et al., 2004b). A administração de adrenalina pode aumentar a incidência de

arritmias, tanto diretamente, pelo aumento da frequência cardíaca, quanto indiretamente, pela diminuição da concentração sanguínea de potássio (STRUTHERS et al., 1985).

Os riscos de aumento da glicemia em pacientes diabéticos (MEECHAN; WELBURY, 1992) e de distúrbios hemodinâmicos em pacientes hipertensos levam ao uso de soluções anestésicas sem vasoconstritores. Contudo tal procedimento exige aplicação de maior dose de anestésicos locais, o que pode levar a arritmia e, seguramente, ao aumento das ações tóxicas sistêmicas deste grupo de drogas. Em pacientes cardiopatas, grande parcela dos diabéticos e hipertensos, esse efeito colateral é preocupante.

1 – Risco do uso de vasoconstritores em pacientes com diabetes mellitus

O *diabetes mellitus* é uma doença sistêmica caracterizada pelo aumento constante da concentração sanguínea de glicose. Atribui-se esta elevação à destruição das células- β do pâncreas, produtoras de insulina (por ação auto-imune), no caso do diabetes tipo I, ou à relativa deficiência na produção de insulina, associada a um quadro prévio de tolerância periférica à ação deste hormônio, no caso do diabetes tipo II. Neste último tipo, os níveis de insulina podem ser normais ou até mesmo elevados, o que demonstra que as células- β do pâncreas são absolutamente funcionais e que os níveis elevados de insulina não são suficientes para compensar a resistência à sua ação (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

O *diabetes mellitus* está relacionado com o aumento da prevalência de hipertensão arterial, 70% dos pacientes com diabetes tipo II e 40% dos portadores do tipo I desenvolvem esta doença, o que agrava o quadro já presente de disfunção macro e microvascular (COOPER, 2001). Os efeitos cardiovasculares do diabetes mellitus são os principais responsáveis pela mortalidade da doença atualmente, e segundo a American Diabetes Association (2016a) há uma estimativa de que 50% dos pacientes com diabetes tipo II desenvolvam insuficiência cardíaca. Além da associação à hipertensão arterial, as alterações microvasculares que levam a neuropatia autonômica e aumento de tônus vascular podem afetar a resposta destes pacientes a soluções anestésicas contendo substâncias adrenérgicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

Um dos riscos do uso de vasoconstritores em pacientes diabéticos é o aumento da pressão sanguínea devido à vasoconstrição sistêmica, visto que alguns estudos mostram que a reatividade vascular de pacientes diabéticos pode estar alterada. A resposta vasoconstritora à adrenalina no antebraço, apresentou-se aumentada no diabetes tipo 2 e diminuída no diabetes tipo 1 (SIVITZ et al., 2007; VAN GURP et al., 2006). As curvas dose-resposta obtidas em aortas isoladas de ratos Zucker diabéticos, modelo geneticamente modificado de hiperinsulinemia, quando da administração de fenilefrina, estão deslocadas para a esquerda. Esses resultados indicam aumento de sensibilidade aos agonistas específicos dos receptores α_1 adrenérgicos (TURNER; WHITE, 1996).

Outros estudos em camundongos diabéticos geneticamente modificados para diabetes tipo I, não obesos, demonstram que a ação da adrenalina seria reduzida, devido a uma menor expressão de receptores (BUCCI et al., 2004). Existem indícios de que o relaxamento da musculatura lisa vascular também estaria alterado, havendo maior produção de óxido nítrico devido à ativação da proteína quinase C (FERRER; MARIN; BALFAGON, 2000). Contudo há maior presença de radicais livres no diabetes e isto pode diminuir a ação do óxido nítrico nas células musculares lisas (HATTORI et al., 1991).

Em pessoas atendidas em serviços odontológicos, não foi definido o papel hiperglicemiante da adrenalina em pacientes diabéticos medicados e controlados: Meechan e Welbury, em 1992, mostram que a administração de 4,4ml de solução a 2% de lidocaína contendo adrenalina na concentração de 1:80.000, em pacientes sedados com midazolam e submetidos a cirurgia oral, aumenta a glicemia e diminui a concentração sanguínea de potássio, se comparada a uma anestesia contendo 3% de prilocaína com 0.03 UI/mL de felipressina. Por outro lado, Tily e Thomas (2007) demonstraram que a administração de solução anestésica contendo 1:80.000 de adrenalina não alterou a glicemia de pacientes diabéticos, quando comparados a pacientes saudáveis submetidos a extração dental. Apenas os pacientes diabéticos que não tomaram sua medicação no dia da cirurgia tiveram um significativo aumento da glicemia em comparação com os outros pacientes. Teoricamente, pacientes diabéticos tipo I não devem apresentar hiperglicemia decorrente da administração de adrenalina, uma vez que suas células β pancreáticas estão destruídas.

O *diabetes mellitus* está altamente correlacionado com a periodontite, sendo uma interação de duas vias: o diabetes aumenta a incidência de periodontite devido

à maior proliferação bacteriana na saliva quando a glicemia não está bem controlada e às alterações da microcirculação próprias da doença; enquanto a presença de doença periodontal representa porta aberta na cavidade oral para a entrada de microrganismos e aumenta os valores de glicemia, dificultando o tratamento do diabetes (NAGPAL, 2015). Destaca-se nesta questão a importância do cirurgião-dentista participar do tratamento e possivelmente da detecção do diabetes, tornando rotina a medida de glicemia antes dos procedimentos cirúrgicos.

Na gengiva, a expressão de proteínas pertencentes ao sistema renina-angiotensina ocorre em pacientes saudáveis e portadores de doença periodontal, caracterizando atividade no tecido periodontal. Apesar de não ocorrer aumento de expressão destas moléculas após desafio com *P. gingivalis*, a perda óssea em ratos induzidos para doença periodontal foi menor nos grupos tratados com bloqueadores dos receptores AT₁ (losartan) e bloqueadores de renina (alisquireno) (SANTOS, 2015).

II – Risco do uso de vasoconstritores em pacientes com hipertensão arterial

A hipertensão arterial é definida por pressão arterial sistólica acima de 140mmHg e pressão arterial diastólica acima de 90mmHg (ROGER et al., 2011). Por afetar o funcionamento cardíaco, o uso de catecolaminas como vasoconstritores poderia levar à arritmia cardíaca ou mesmo à fibrilação ventricular, pela ação no receptor β_1 . Este fato provoca muitas discussões quanto ao uso de vasoconstritores em cirurgias orais de pacientes hipertensos.

O “Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure” (JNC 7) de agosto de 2004, estabelece que os valores limites para atendimento eletivo odontológico seriam 160/100 mmHg, respectivamente para a pressão arterial sistólica e diastólica (GLICK, 2004). Neste relatório também se define que a quantidade de adrenalina, presente em alguns poucos tubetes de anestésicos, não deveria ser capaz de promover alterações cardiovasculares significativas em pacientes hipertensos. A American Dental Association considera a adrenalina como o vasoconstritor mais seguro para pacientes hipertensos, aceitando a aplicação de até 40µg por via infiltrativa, o que corresponde a pouco mais que dois tubetes de anestésico local com adrenalina na proporção 1:100.000 (HERMAN; KONZELMAN; PRISANT, 2004). Um número significativo de pacientes com pressão arterial elevada ainda não diagnosticada, ou

mesmo que já estão cientes do quadro hipertensivo e não tomam medicamentos regularmente, procuram com maior frequência o Cirurgião-Dentista do que outros serviços médicos (LITTLE, 2000).

Bader, Bonito e Shugars (2002), em revisão sistemática dos efeitos cardiovasculares da adrenalina em pacientes odontológicos portadores de hipertensão, procuraram identificar qualquer tipo de reação adversa cardiovascular que ocorresse em pacientes hipertensos descontrolados, quando do uso de anestésicos locais contendo adrenalina ou de fios de retração gengival impregnados dessa substância. A falta de dados concretos em odontologia sobre os efeitos colaterais nesta população fica evidente devido à pesquisa em 373 estudos sobre o uso de anestésicos locais associados à adrenalina e 33 estudos sobre fios de retração gengival, dentre os quais apenas 6 preencheram os critérios de inclusão. Nestes casos, 325 pacientes, sendo 177 hipertensos, o uso de adrenalina na anestesia dentária desses pacientes não controlados, provocou pequenos aumentos não significativos da pressão arterial sistólica e diastólica. Nenhuma reação adversa mais séria foi identificada. Herman e Konzelman (1996), em revisão dos diferentes tipos de angina e sua importância para o profissional da Odontologia, afirmam que, em tais pacientes, o medo e a dor são os principais fatores desencadeantes de crises anginosas. Dessa maneira, recomendam a sedação pré-operatória com benzodiazepínicos ou óxido nitroso e enfatizam a importância de um bom controle da dor trans-operatória.

Alguns estudos em modelos animais de hipertensão demonstraram que na vigência desta doença o sistema nervoso simpático está mais ativo devido à ação da angiotensina nos vasos (FARIA; SALGADO, 1992). Os efeitos das drogas adrenérgicas seriam mais importantes nesta população, devido a uma maior expressão de receptores e maior sensibilidade na sua ativação. Um dos tratamentos utilizados para hipertensão essencial em humanos resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado é a denervação da glândula adrenal, reduzindo esta hipersensibilidade.

Outra opção seria o uso de felipressina, já que não interfere no funcionamento do sistema nervoso autônomo, por não interagir com receptores adrenérgicos. Em estudos sobre a segurança do atendimento odontológico em pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio a menos de 6 meses, ou portadores de angina pectoris instável, quando da realização de extrações dentárias ou pulpectomias sob

anestesia local, foi relatada a utilização de 1 a 2 tubetes de prilocaína com felipressina em todos os pacientes. Num total de 79 procedimentos, não aconteceu nenhuma complicação intraoperatoria (NIWA; SATO; MATSUURA, 2000). Apesar de sua capacidade bem descrita na literatura para constriar o leito coronariano, nenhum paciente apresentou dor no peito ou qualquer alteração significativa do eletrocardiograma, depois da anestesia com felipressina. Meechan et al. (1997), em estudo realizado em pacientes que sofreram transplantes cardíacos, notaram menores efeitos hemodinâmicos da felipressina, quando comparada à adrenalina. Por outro lado, Inagawa, Ichinohe e Kaneko (2010), verificaram que a felipressina injetada na língua de coelhos em associação com a prilocaína, na proporção utilizada nas soluções anestésicas odontológicas, provocou redução do fluxo sanguíneo aórtico e coronariano, além de reduzir a tensão tissular de oxigênio no miocárdio. A adrenalina, sob as mesmas condições, aumentou os fluxos sanguíneos e não produziu alteração na tensão de oxigênio do músculo cardíaco. Aponta também redução da frequência cardíaca produzida pela injeção de felipressina.

Diante dos dados expostos anteriormente, não há uma conduta definida para o uso de vasoconstritores em cirurgias orais de pacientes diabéticos e hipertensos. A prevalência da hipertensão arterial é desproporcionalmente maior em diabéticos do que na população em geral (SOWERS; HAFFNER, 2002), e nenhum estudo anteriormente citado aborda a reatividade vascular das duas doenças associadas. Sendo duas doenças crônicas e sistêmicas que danificam o sistema circulatório, e especialmente o endotélio vascular, faz-se necessária a verificação de uma possível sinergia entre elas na alteração da reatividade vascular. Nenhum estudo descrito na literatura verifica a expressão de RNAm dos receptores envolvidos na reatividade vascular da adrenalina (receptores α_{1a} e β_2) ou felipressina (receptor V_{1A}), além dos receptores envolvidos na modulação adrenérgica da angiotensina (receptores AT1 e AT2), em modelos isogênicos em que tanto o diabetes quanto a hipertensão foram induzidas através de procedimento externo. Alguns estudos avaliam a expressão de receptores adrenérgicos em linhagens geneticamente modificada para diabetes, o que dificulta a avaliação se as alterações decorrem da hiperglicemia ou das alterações genéticas que levam à doença.

Os modelos experimentais utilizados neste estudo foram a hipertensão renovascular e o diabetes induzido por estreptozotocina conforme descrito em estudo anterior (FLEURY, 2012). O modelo de hipertensão renovascular descrito por

Goldblatt, hipertensão um-rim, um clip (1R1C), é interessante por apresentar desenvolvimento semelhante ao da hipertensão essencial exibida pelos seres humanos, e neste modelo, tem sido estudada a hiperatividade simpática que ocorre nos animais hipertensos (FARIA; SALGADO, 1992). O diabetes experimental induzido por estreptozotocina, um análogo da N-acetilglucosamina, causadora de apoptose das células β pancreáticas, se aproxima do diabetes tipo I e caracteriza-se por forte hiperglicemia, que pode ser observada um dia após a injeção intraperitoneal, além de alterações renais e vasculares (TESCH; ALLEN, 2007).

Devido ao reduzido número de informações disponíveis na literatura sobre os riscos da utilização de drogas vasoconstritoras em pacientes diabéticos e hipertensos, muitos profissionais podem optar pela utilização de anestésicos locais isolados, o que pode resultar em efeitos colaterais mais graves e comuns como anteriormente descrito. Com o intuito de contribuir para o avanço do conhecimento sobre o impacto destas duas doenças crônicas na resposta funcional de drogas vasoconstritoras e a expressão gênica dos seus receptores, este estudo visa avaliar a reatividade vascular para adrenalina (vasoconstrição e vasodilatação) e felipressina (vasoconstrição) em leitos arteriais mesentéricos de modelos animais que simulem as duas situações clínicas.

2 Proposição

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como proposição geral avaliar os efeitos vasculares (vasoconstrição e vasodilatação) e expressão de RNAm de receptores de drogas vasoconstritoras em leito arterial mesentérico de ratos normotensos, diabéticos, hipertensos renais um-um, um clip (1R-1C) e 1R-1C diabéticos

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar a vasoconstrição resultante da administração de adrenalina em doses correspondentes à presente em 1, 2, 4, 8 e 16 tubetes em mesentério isolado de ratos controle, diabéticos, hipertensos renais 1R-1C e 1R-1C diabéticos.
- 2) Avaliar a vasoconstrição resultante da administração de felipressina em doses correspondentes à presente em 1, 2, 4, 8 e 16 tubetes em mesentério isolado de ratos controle, diabéticos, hipertensos renais 1R-1C e 1R-1C diabéticos.
- 3) Avaliar a vasodilatação resultante da administração de adrenalina em doses correspondentes à presente em 1, 2, 4, 8 e 16 tubetes em mesentério isolado de ratos controle, diabéticos, hipertensos renais 1R-1C e 1R-1C diabéticos.
- 4) Comparar a vasoconstrição promovida por adrenalina e felipressina a partir da conversão da dose utilizada em ng ou mUI para dose presente no número equivalente de tubetes.
- 5) Avaliar a expressão de RNA mensageiro para receptores α 1A-adrenérgicos, β 2-adrenérgicos e V1A para vasopressina em leitos arteriais mesentéricos isolados dos mesmos animais correlacionar com os resultados de vasoconstrição e vasodilatação.
- 6) Avaliar a expressão de RNA mensageiro para receptores de angiotensina II (AT-1_A, AT-1_B e AT-2) em leitos arteriais mesentéricos isolados dos mesmos animais correlacionar com os resultados de vasoconstrição e vasodilatação.

3 Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais utilizados

Todos os procedimentos descritos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética para Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru. Foram utilizados ratos da cepa Wistar, machos, com peso corporal entre 110 e 320 g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e submetidos à dieta habitual, com livre acesso à ração e água e ciclo de 12 horas com luz e 12 horas em ambiente escuro. Protocolo nº 021/2012.

Dentro de cada lote os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: controle, ratos diabéticos, ratos hipertensos e ratos diabéticos e hipertensos. Dentro destes grupos os ratos foram divididos em 3 outros grupos: vasoconstrição para adrenalina, vasodilatação para adrenalina e vasoconstrição para felipressina. Os animais de todos os grupos foram pesados e identificados aos 45 dias após seu nascimento.

3.2 – Produção da Hipertensão 1R1C

Ratos Wistar (grupos 3 e 4), pesando de 110 a 170 g foram anestesiados com uma mistura, em igual proporção, de cloridrato de quetamina (Dopalen® - Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal) e cloridrato de xilazina (Anasedan® - Sespo Indústria e Comércio Ltda., Divisão Vetbrands Saúde Animal) (50mg+10mg/ml/kg de peso) injetada por via intramuscular na pata traseira, e tiveram o abdômen aberto, para a exposição do rim esquerdo, conforme anteriormente descrito (FLEURY et al., 2015). Um “clip” de prata com abertura de 0,25mm foi instalado ao redor da artéria renal esquerda, enquanto o rim direito foi removido cirurgicamente e a cavidade abdominal suturada em seguida. Todos os ratos receberam uma dose de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Fontoura Wyeth S.A.), num volume de 0,1 mL, ao final da cirurgia.

Os animais normotensos foram de mesmo lote e peso que os anteriores, porém não sofreram procedimento cirúrgico devido ao fato de resultados anteriores, obtidos pelo Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), terem mostrado que animais submetidos apenas à

nefrectomia unilateral direita, apresentam registros de pressão arterial e reatividade vascular semelhantes aos animais intactos (FARIA; SALGADO, 1992).

3.3 – Indução Experimental do Diabetes mellitus

Duas semanas após a cirurgia de indução à hipertensão 1R1C, os ratos Wistar foram pesados e novamente identificados para o cálculo da quantidade de estreptozotocina a ser utilizada. Os frascos de estreptozotocina (Streptozotocin - Sigma-AldrichCo. LLC.) foram armazenados entre 0 e -20°C antes de sua utilização. No dia da indução, a quantidade total de estreptozotocina foi pesada e diluída em solução fisiológica estéril para obtenção de uma solução mãe de aproximadamente 50mg/ml. Alíquotas foram separadas em seringas de 1ml para injeção via subcutânea, com quantidades equivalentes à dose de 45mg/kg de peso para ratos íntegros e uninefrectomizados. Devido à ausência de literatura científica sobre o uso de estreptozotocina por via subcutânea foi realizada a primeira tentativa de indução através da injeção por via intraperiotoneal conforme descrito em estudo do Laboratório de Bioquímica da FOB-USP (LIMA LEITE, 2014). Duas semanas após a cirurgia de implantação do clip, ou tempo correspondente para os grupos normotensos, os animais foram pesados e receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina dissolvida em solução salina gelada. Contudo após uma semana nenhum animal desenvolveu o diabetes, por falta de tempo para padronização do método e visando evitar perdas desnecessárias de animais, optou-se pela indução por via subcutânea conforme anteriormente descrito (FLEURY, 2012).

A injeção de estreptozotocina foi realizada logo após a separação das alíquotas em seringas, armazenadas em gelo, através da via subcutânea, na região abdominal. Uma semana após a injeção, a glicemia basal foi testada através de sangue periférico da cauda dos animais, após limpeza da mesma com álcool 70%, utilizando o aparelho glicosímetro OneTouch Ultra (OneTouch® - Johnson & Johnson, Medical Devices&DiagnosticGroup). Ratos com a glicemia acima de 178mg/dl foram aceitos nos grupos diabéticos e animais com valores intermediários, entre 120 e 170mg/dl, sofreram novo processo de indução, com dose de 40mg/kg de peso, testando-se novamente a glicemia antes da última cirurgia (TESCH, 2007).

Figura 1: Fluxograma dos procedimentos realizados nos grupos experimentais.

3.4 – Implantação dos cateteres e registro da Pressão Arterial Direta

Para a medida direta da pressão arterial, os animais de todos os grupos tiveram um cateter de polietileno PE-50 (Diâmetro Externo=0,97mm e Diâmetro Interno=0,58mm; Clay Adams) implantado em sua artéria carótida esquerda, sob anestesia, pela mistura de quetamina e xilazina, sendo essa cânula heparinizada com pequena quantidade de heparina sódica (Billi Farmacêutica Ltda, frasco-ampola com 5.000 UI/mL), preenchida com solução fisiológica e ocluída na sua extremidade distal. Todos os experimentos foram realizados entre 28 e 35 dias após a implantação do “clip” de prata, período necessário para que o quadro hipertensivo estivesse bem caracterizado, com a pressão arterial média dos animais acima de 140 mmHg, (FARIA; SALGADO, 1992). A medida de pressão arterial direta foi realizada com o animal anestesiado, logo após a implantação dos cateteres.

Para o registro da pressão arterial o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (PhysiologicalPressureTransducer – ADInstrumentsPty. Ltd. – Australia) acoplado ao sistema PowerLab 4/30 de registro invasivo de Pressão Arterial (ADInstrumentsPty. Ltd), utilizando software adequado (Chart Pro – ADInstrumentsPty. Ltd). Em medida basal de pressão arterial, os animais do grupo 1R-1C que não apresentaram pressão média igual ou superior a 140 mmHg foram descartados.

3.5 – Experimentos de Reatividade Vascular em Leito Arterial Mesentérico

Com os animais ainda anestesiados após a medida de pressão direta, a parede abdominal foi exposta e a artéria mesentérica principal canulada com cateter de polietileno preenchido com solução salina fisiológica heparinizada e ocluído em sua porção distal. O animal foi então eutanaseado com dose excessiva de anestésico tiopental (Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos e Farmacêuticos

Ltda.). Após perfusão com solução de Krebs modificada heparinizada, o leito arterial mesentérico foi então cuidadosamente removido da cavidade abdominal e retirou-se os órgãos do aparelho digestivo (**Figura 1A e B**). Transferiu-se o leito arterial mesentérico canulado para ser perfundido por bomba a 4 mL/min (LKB-2115 multiperpepump) dentro de banho em jaqueta de vidro a 37°C(**Figura 1C**).

Figura 2: Exemplo de leito arterial mesentérico logo após ser canulado e removido da cavidade abdominal (A) e após remoção dos órgãos irrigados por ele em jaqueta de vidro com banho a 37°C e perfundido em solução nutritiva de Krebs modificada (B). Sistema de perfusão da solução nutritiva de Krebs modificada com serpentina e jaqueta de vidro com banho a 37°C acoplado a sistema de medida de pressão: transdutor ligado ao sistema PowerLab 4/30 (C).

A solução nutritiva de Krebs modificada utilizada para perfusão do leito arterial mesentérico contém: cloreto de sódio (NaCl) 120,0mM (7013 mg/L), cloreto

de potássio (KCl) 4,7mM (350,4 mg/L), cloreto de cálcio (CaCl_2) 3,0mM (332,9 mg/L), cloreto de magnésio (MgCl_2) 1,4mM (284,6 mg/L), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 25,0mM (4450 mg/L), difosfato de potássio (KH_2PO_4) 1,2mM (163,3 mg/L), glicose 11,0mM (1982 mg/L), EDTA 0,03mM (11,2 mg/L), equilibrada com 95% O_2 e 5% CO_2 (carbogênio). A variação de pressão no leito arterial mesentérico foi monitorado por um transdutorconectado ao sistema de medida de pressão (PowerLab 4/30, Chart Pro, AD Instruments Ltda.), conectado a um braço da cânula na artéria mesentérica. Para a avaliação da vasodilatação, o leito arterial mesentérico foi previamente contraído com 25 μM de fenilefrina (Sigma AldrichCo. LLC.) na solução de Krebs. Após 15 minutos para estabilizar, o registro de resistência vascular foi medido inicialmente e em doses aleatórias de adrenalina e felipressina injetadas em bôlus na bomba de perfusão juntamente à solução de Krebs modificada.

3.6 – Curvas Dose-Resposta

a) Curvas dose-resposta de vasoconstrição e vasodilatação para adrenalina: após a estabilização dos mesentérios dos ratos normotensos (controle), diabéticos, hipertensos 1R1C e hipertensos 1R1C-diabéticos, já conectados ao sistema de registro, foram realizadas injeções de adrenalina (Adren® - Hipolabor Farmacêutica Ltda) no sistema de perfusão nas doses de 80, 160, 320, 640 e 1280 ng, diluídas em 10 μL de solução salina fisiológica. As injeções foram realizadas de forma aleatória, não existindo nenhuma sequência específica para injeção das diferentes doses, respeitando-se sempre um intervalo mínimo de 3 minutos após a estabilização do sistema para injetar-se nova dose. As curvas de vasodilatação foram realizadas com a adição de 10 μM de fenilefrina na solução nutritiva de Krebs modificada.

b) Curvas dose-resposta de vasoconstrição para felipressina (octapressin): de modo semelhante às curvas dose-resposta para adrenalina, após a estabilização dos mesentérios dos ratos normotensos (controle), diabéticos, hipertensos 1R1C e hipertensos 1R1C-diabéticos, receberam injeções de felipressina exógena, diluídas em solução salina fisiológica nas doses de 0,25; 0,5; 1; 2 e 4mUI (Unidades Internacionais) em 10 μL de volume.

Estas doses correspondem respectivamente ao conteúdo de 1, 2, 4, 8 e 16 tubetes de solução anestésica contendo adrenalina 1:100.000 e felipressina

0,054UI considerando a proporção de peso entre o homem (70 kg) e o rato (300mg) adultos, possibilitando a comparação entre a vasoconstrição provocada por ambos os vasoconstritores estudados devido ao fato de as unidades de medidas serem diferentes.

Considerando que um tubete de anestésico local contém 1,8mL de adrenalina a 1:80.000 ou felipressina 0,054UI e são utilizados em seres humanos de peso padrão de 70kg, as doses utilizadas neste estudo correspondem ao conteúdo de vasoconstritor presente em 1 (80ng ou 0,25mUI), 2 (160ng ou 0,5mUI), 4 (320ng ou 1mUI), 8 (640ng ou 2mUI) e 16 (1280ng ou 4mUI) tubetes equivalentes para o peso dos ratos, em média 300g. Esta conversão possibilitou a comparação direta entre a vasoconstrição provocada por adrenalina e por felipressina. Nos registros de pressão de perfusão do leito arterial mesentérico procedeu-se a análise dos seguintes parâmetros:

- I. Vasoconstrição (ou vasodilatação) máxima
- II. Duração da resposta
- III. Integral
- IV. Integral sobre a linha basal
- V. Tempo para resposta máxima

Os parâmetros avaliados foram descritos no registro obtido de vasoconstrição para adrenalina (**Figura 3**).

3.7 – Determinação da Expressão Gênica de Receptores Adrenérgicos, para Vasopressina e do Sistema Renina-Angiotensina

Uma pequena porção do leito arterial mesentérico foi removido antes dos experimentos anteriormente descritos, sendo estocados na solução de RNAlater (Ambion®) a -80°C. Primeiramente foi realizada a extração do RNA das amostras, foram descongeladas e transferidas para tubo de microcentrífuga contendo a solução de lise celular do RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Germany) com aproximadamente 0,100mg de *beats* de vidro. Para ocorrer a lise das células do leito arterial mesentérico, esta mistura foi colocada em agitação de alta frequência no agitador recíproco. Em seguida a amostra foi centrifugada para separar os restos celulares do sobrenadante que contém o RNA. Este sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo álcool absoluto, e esta mistura foi colocada numa coluna de sílica presente no kit, que retém o RNA. Foram realizadas duas lavagens, com

soluções específicas do kit, foram providas nestas colunas e a última etapa constituiu na eluição do RNA após a adição de água livre de RNase nas colunas contendo o RNA (SANTOS et al., 2015). Devido a uma intercorrência com o agitador para lise da amostra, em que uma amostra do grupo controle apresentou reduzida quantidade de RNAm, utilizou-se o $n=4$ para todos grupos.

Aproximadamente 120ng do RNA total foi transcrito com o Quanti Tect Reverse Transcription Kit (Qiagen®, Germany), de acordo com as orientações do fabricante. Não foi necessário tratamento prévio da amostra com DNase antes da transcrição porque as sondas da Reação em Cadeia da Polimerase (em inglês, Polymerase Chain Reaction - PCR) foram desenvolvidas em porções entre dois exons do gene alvo, sendo impossibilitada a transcrição do DNA genômico por não anelar com introns. Após a transcrição reversa, os DNAs complementares (cDNAs) foram misturados ao Taqman gene expression mastermix (Applied Biosystems, USA) o que contém a enzima Taq-polimerase, as bases nitrogenadas A, T, C e G, o cloreto de magnésio e o tampão que confere à reação as condições ideais de amplificação. A esta mistura foram adicionados os primers e sondas marcadas com o fluoróforo FAM para a detecção e quantificação dos alvos em estudo.

Os primers e sondas utilizados foram específicos dos receptores α_{1A} e β_2 -adrenérgico, receptor V_{1A} específico de vasopressina, receptor para angiotensina II tipo 1 (AT-1) e tipo 2 (AT-2), fornecidos em ensaios pré-fabricados (Life Technologies®). Os números de catálogo dos ensaios que contêm estes primers e sondas marcadas podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Números de catálogos dos ensaios pré-fabricados utilizados nas reações de PCR.

Alvo do qPCR	Número de catálogo (Applied Biosystems, USA)
α_{1A} -adrenoceptor	Rn00567876m1
β_2 -adrenoceptor	Rn00563688m1
V_{1A}	Rn00583910m1
AT-1 ^a	Rn02758772 s1
AT-1B	Rn02132799 s1
AT-2	Rn00560677 s1

Após o preparo das reações em placas de 384 poços (Applied Biosystems, USA), as mesmas foram alocadas no aparelho de qPCR Viia 7 (Applied Biosystems,

USA) e as seguintes condições de ciclagem foram utilizadas para a realização das amplificações: temperatura inicial de 95°C por 10 minutos para a ativação da taq polimerase seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundo e 60°C por 1 minuto.

Para se definir a expressão relativa de cada gene foi primeiramente calculada a diferença de luminescência da placa entre o alvo e um gene de referência (β -actina) em determinada linha de corte (threshold) definida automaticamente pelo programa Viia 7 para cada grupo estudado (ΔC_t). Após, foi determinado o $\Delta\Delta C_t$: diferença entre o ΔC_t da amostra testada com uma amostra de referência (mediana do grupo controle). A quantificação relativa foi determinada para cada gene como $QR = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

3.8 – Análise Estatística

Nos grupos experimentais em que mais de uma resposta foi mensurada num mesmo animal (curvas dose-resposta), foi utilizada análise de variância de medidas repetidas a um critério de classificação (Repeated Measures ANOVA One Way). Quando as curvas completas de dois ou mais grupos foram comparadas, utilizou-se a análise de variância de medidas repetidas a dois critérios de classificação (Repeated Measures ANOVA Two Ways). Para comparação dos resultados de grupos independentes, foi utilizada a análise de variância a um critério de classificação (ANOVA One Way).

Havendo diferença significativa entre as doses em cada curva ou entre grupos independentes e distribuição normal dos dados, a comparação entre os pares foi realizada pelo método de Holm-Sidak, comparação entre dois grupos, ou de Tuckey, comparação de vários grupos. Em casos onde não ocorreu distribuição normal, os dados foram analisados por testes não paramétricos como o teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos e de Kruskal-Wallis para comparação entre vários grupos (WALLESTEIN et al., 1980). O nível de significância estabelecido foi de 5%.

4 Resultados

4. RESULTADOS

4.1 - Registros dos experimentos

Apresentam-se, nas figuras abaixo, exemplos dos registros de variação de pressão realizados com o software Chart 5 Pro®, respectivamente, para os experimentos onde se avaliou a vasoconstrição provocada pela adrenalina e pela felipressina e a vasodilatação provocada por adrenalina, em leito arterial mesentérico de ratos normotensos.

Figura 3: Exemplo de registro de reatividade vascular em leito arterial mesentérico de rato **normotenso**. As alterações de pressão observadas são decorrentes de vasoconstrição provocada por diferentes doses de **adrenalina**. Escala do eixo vertical em mmHg. Escala do eixo horizontal em minutos. Esquema de como os parâmetros foram calculados.

Figura 4: Exemplo de registro de reatividade vascular em leito arterial mesentérico de rato **normotenso**. As alterações de pressão observadas são decorrentes de vasoconstrição provocada por diferentes doses de **felipressina**. Escala do eixo vertical em mmHg. Escala do eixo horizontal em minutos.

Figura 5: Exemplo de registro de reatividade vascular em leito arterial mesentérico de rato **normotenso**. As alterações de pressão observadas são decorrentes de vasodilatação provocada por diferentes doses de **adrenalina**. Escala do eixo vertical em mmHg. Escala do eixo horizontal em minutos.

4.2 – Valores basais

Os valores basais de Peso e Glicemia determinados antes da cirurgia para isolamento do leito arterial mesentérico e os valores basais de Pressão Arterial Média, Sistólica e Diastólica, Frequência Cardíaca determinados após inserção do cateter na artéria carótida esquerda dos animais serão apresentados inicialmente na **Tabela 1** com a média de todos os animais, não sendo diferenciados os participantes dos experimentos de vasoconstrição ou vasodilatação de adrenalina ou felipressina.

Tabela 1 – Valores basais de: pressão arterial média, sistólica e diastólica, frequência cardíaca, peso e glicemia dos animais **normotensos**, **diabéticos**, **hipertensos 1R-1C** e **hipertensos 1R-1C-diabéticos**. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$ em comparação com normotensos. $^{\dagger}p < 0,05$ em comparação com diabéticos. $^{\ddagger}p < 0,05$ em comparação com hipertensos.

	Pressão Arterial Média	Pressão Arterial Sistólica	Pressão Arterial Diastólica
Normotenso (n=15)	109,96 $\pm$ 3,57	127,40 $\pm$ 3,37	91,02 $\pm$ 3,38
Diabético (n=15)	104,61 $\pm$ 2,83	122,02 $\pm$ 2,97	84,80 $\pm$ 2,81
Hipertenso (n=15)	160,08 $\pm$ 2,61 ^{*†}	190,74 $\pm$ 3,75 ^{*†}	135,01 $\pm$ 3,64 ^{*†}
Hipertenso-Diabético (n=15)	157,83 $\pm$ 3,26 ^{*†}	187,77 $\pm$ 4,97 ^{*†}	133,75 $\pm$ 2,98 ^{*†}

	Frequência Cardíaca	Peso	Glicemia
Normotenso (n=15)	236,01 $\pm$ 6,78	423,07 $\pm$ 12,83	105,13 $\pm$ 2,53
Diabético (n=15)	235,37 $\pm$ 5,65	428,93 $\pm$ 15,80	383,40 $\pm$ 32,96 ^{*†}
Hipertenso (n=15)	245,45 $\pm$ 5,17	364,80 $\pm$ 16,54 ^{*†}	101,27 $\pm$ 3,18
Hipertenso-Diabético (n=15)	233,44 $\pm$ 5,74	365,27 $\pm$ 9,28 ^{*†}	448,40 $\pm$ 34,84 ^{*†}

Para facilitar a comparação entre os grupos experimentais: vasoconstrição adrenalina, vasoconstrição felipressina e vasodilatação adrenalina, os valores basais serão apresentados em gráficos com as médias de todos os animais e os grupos separados.

Figura 6 – Pressão Arterial Média, Sistólica e Diastólica (basal em repouso) registradas por pressão arterial direta em animais **normotensos(controle)**, **diabéticos**, **hipertensos 1R-1C** e **hipertensos 1R-1C-diabéticos** previamente aos experimentos com adrenalina e felipressina. Média $\pm$ epm (erro padrão da média). * $p < 0,05$ em comparação com normotensos e diabéticos.

Pode-se verificar a existência de diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os grupos, para os valores registrados de pressão arterial sistólica, média e diastólica. Na **figura 6** é possível verificar que a indução de diabetes *mellitus* não alterou significativamente os valores de pressão arterial, sendo os animais **hipertensos 1R-1C** semelhantes aos **1R-1C-diabéticos** e os animais **normotensos** semelhantes aos **diabéticos**.

Figura 7 – Frequência Cardíaca registrada por pressão arterial direta em animais **normotensos (controle)**, **diabéticos**, **hipertensos 1R-1C** e **hipertensos 1R-1C-diabéticos**. Média $\pm$ epm (erro padrão da média).

Na **figura 7** é possível observar que os grupos não apresentaram diferença significativa para os valores basais de frequência cardíaca. O fato de os ratos estarem anestesiados provocou uma redução deste parâmetro, normalmente em torno de 300-350 BPM, devido ao efeito colateral da quetamina.

Os grupos hipertensos apresentaram pesos significativamente inferiores aos grupos controle e diabético não hipertenso (**Figura 8**; * $p < 0,05$).

Figura 8 – Peso registrado antes dos procedimentos cirúrgicos em animais **normotensos (controle)**, **diabéticos**, **hipertensos 1R-1C** e **hipertensos 1R-1C-diabéticos**. Média $\pm$ epm (erro padrão da média).

* $p < 0,05$ em comparação com normotensos (controle) e diabéticos.

Figura 9 – Glicemia medida por sangue caudal com os animais **normotensos (controle)**, **diabéticos**, **hipertensos 1R-1C** e **hipertensos 1R-1C-diabéticos** acordados anteriormente aos experimentos. Média $\pm$ epm (erro padrão da média). * $p < 0,05$ comparado aos normotensos e hipertensos.

Os valores de glicemia (**Figura 9**) foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos normoglicêmicos (**controle normotenso** e **hipertensos**) e diabéticos (**diabéticos** e **1R-1C diabéticos**). Os valores de peso diferiram apenas entre os grupos normotensos (**controle** e **diabéticos**) e hipertensos (**hipertensos** e **1R1C-diabéticos**, $p < 0,05$). A maioria dos valores basais não apresentou comportamento diferente entre os grupos estudados, demonstrando homogeneidade, apenas o peso dos animais hipertensos nos experimentos de vasodilatação apresentou-se significativamente superior aos outros dois grupos.

4.3 – Reatividade Vascular em Leito Arterial Mesentérico

4.3.a – Vasoconstrição provocada por adrenalina

4.3.a.1 – Diferença de pressão máxima por vasoconstrição

Figura 10: Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 11: Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Na **figura 10** são apresentadas diferenças máximas de pressão geradas pela vasoconstrição quando o leito arterial mesentérico foi exposto a adrenalina nas diferentes doses (80, 160, 320, 640 e 1280 ng). Para todos os grupos a vasoconstrição apresentou variação dose-dependente ($p < 0,05$), porém quando comparadas as curvas através do teste de ANOVA twoways não houve diferença estatística entre as curvas de cada grupo (**Figura 11**).

4.3.a.2 – Tempo para pressão máxima por vasoconstricção

Figura 12: Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstricção após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 13: Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstricção após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Nas **figuras 12 e 13** apresentou-se o tempo necessário para a resposta máxima de vasoconstricção obtida após exposição dos leitos arteriais mesentéricos dos grupos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos a adrenalina. Apenas o grupo diabético apresentou tempo para resposta máxima dependente da dose de adrenalina (**Figura 12-B**). Quando comparados os quatro grupos entre si, observa-se que o grupo controle apresentou tempo significativamente inferior aos grupos diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos.

4.3.a.3 – Duração da resposta vasoconstritora

Figura 14: Duração da resposta vasoconstritora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 15: Duração da resposta vasoconstritora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p<0,05$

A duração da resposta vasoconstritora foi proporcionalmente maior conforme a dose de adrenalina a que os leitos arteriais mesentéricos dos quatro grupos foram expostos (**Figura 14**, * $p<0,05$). Os grupos diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos apresentaram duração maior nas menores doses de adrenalina e duração menor nas maiores doses quando comparados ao controle (**Figura 15**, * $p<0,05$)

4.3.a.4 – Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora

Figura 16: Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 17: Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Nas **figuras 16 e 17** apresentaram-se a integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora obtida após exposição dos leitos arteriais mesentéricos dos grupos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos a adrenalina. Na **figura 16** é possível observar que todos os grupos apresentaram aumento no valor de integral dependente da dose de adrenalina administrada (* $p < 0,05$). O grupo diabético apresentou integral significativamente inferior aos outros grupos, enquanto o grupo controle apresentou maiores valores excetuando-se a dose de 1280 ng (* $p < 0,05$).

4.3.a.5 – Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora

Figura 18: Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para *adrenalina* em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 19: Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

O valor de integral sobre a linha de base (baseline) refere-se a todo valor de pressão e tempo da resposta que supera o valor basal, traçando-se uma linha como referência. Este dado da resposta comportou-se de maneira dose-dependente nos quatro grupos estudado (**Figura 18**, * $p < 0,05$). O leito arterial mesentérico do grupo diabético apresentou valor de integral sobre linha de base significativamente inferior ao controle para todas as doses de adrenalina, enquanto o grupo hipertenso-diabético foi superior ao controle apenas na última dose.

4.3.b) Vasoconstrição provocada por felipressina

4.3.b.1 – Diferença de pressão máxima por vasoconstrição

Figura 20: Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição a **felipressina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0.05$

Figura 21: Curva dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição a *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Nas **figuras 20 e 21** apresentaram-se a resposta máxima de vasoconstrição obtida após exposição dos leitos arteriais mesentéricos dos grupos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos a felipressina. Os quatro grupos estudados apresentaram aumento de pressão por vasoconstrição dependente da dose administrada (**Figura 20**, $*p < 0,05$). Quando comparados os quatro grupos entre si, observa-se que não houve diferença significativamente, porém há uma tendência de tanto a hipertensão quanto o diabetes associados ou não reduzirem a resposta vasoconstritora a felipressina.

4.3.b.2 – Tempo para pressão máxima por vasoconstricção

Figura 22: Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstricção após exposição a *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 23: Tempo para aumento máximo de pressão causado por vasoconstrição após exposição a *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Apenas o grupo hipertenso apresentou tempo necessário para aumento máximo de pressão decorrente de vasoconstrição por felipressina dependente da dose (**Figura 22 – C**, $*p < 0,05$). Houve uma tendência não significativa de o diabetes reduzir o tempo para a vasoconstrição máxima, já que não houve diferença estatística quando se comparou os quatro grupos (**Figura 23**). É possível observar que tempo para atingir a resposta máxima foi bem maior para felipressina do que para adrenalina (**Figuras 12 e 13**).

4.3.b.3 – Duração da resposta vasoconstritora

Figura 24: Duração da resposta vasoconstritora para *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 25: Duração da resposta vasoconstritora para *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

A duração da resposta vasoconstritora a felipressina foi apresentada nas **figuras 24 e 25**. Apenas os grupos controle e diabéticos apresentaram duração da vasoconstrição dependente da dose de felipressina administrada no sistema de perfusão do leito arterial mesentérico (* $p < 0,05$). O grupo controle apresentou duração da resposta vasoconstritora significativamente superior aos grupos diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos principalmente nas doses superiores.

4.3.b.4 – Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora

Figura 26: Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 27: Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora para *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Os grupos controle, diabéticos e hipertensos apresentaram valores de integral (área sob a curva) aumentando proporcionalmente com a dose de felipressina administrada (**Figura 26 – A, B e C**, * $p < 0,05$). O grupo hipertenso-diabético não apresentou variação significativa da integral com a dose de felipressina (**Figura 26 - D**). Quando comparados os quatro grupos, houve diferença significativa nos valores de integral (área sob a curva): o grupo controle apresentou valores superiores de integral quando comparado aos grupos diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos.

4.3.b.5 – Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora

Figura 28: Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 29: Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora para *felipressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Nas **figuras 28 e 29** apresentou-se a integral sobre a linha de base da resposta vasoconstritora a felipressina nos leitos arteriais mesentéricos dos grupos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Apenas os grupos controle e hipertensos-diabéticos apresentaram valores de integral sobre a linha de base dependentes da dose de felipressina (**Figura 28 – A e D**, * $p < 0,05$). Tanto o diabetes quanto a hipertensão, associados ou não, causaram uma redução significativa nos valores de integral sobre a linha de base (**Figura 29**, * $p < 0,05$).

4.3.c – Vasodilatação provocada por adrenalina

4.3.c.1 – Diferença de pressão mínima por vasodilatação

Figura 30: Curva dose-resposta de diferença de pressão máxima causada por vasodilatação após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$.

Figura 31: Curva dose-resposta de diferença de pressão máxima causada por vasodilatação após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Nas **figuras 30 e 31** são apresentados os valores de diferença mínima de pressão causada por vasodilatação a adrenalina. Apenas o grupo hipertenso apresentou variação significativa de vasodilatação dependendo da dose de adrenalina utilizada (**Figura 30 – C**, $*p < 0,05$). Houve uma tendência não significativa de a resposta vasodilatadora ser inferior para os grupos diabéticos e hipertensos quando comparados aos grupos controle e hipertenso-diabético (**Figura 31**).

4.3.c.2 – Tempo para redução máxima de pressão por vasodilatação

Figura 32: Tempo para redução máxima de pressão causada por vasodilatação após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Figura 33: Tempo para redução máxima de pressão causada por vasodilatação após exposição a **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Nas **figuras 32 e 33** apresentaram-se o tempo necessário para a resposta máxima de vasodilatação obtida após exposição dos leitos arteriais mesentéricos dos grupos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos já contraídos a adrenalina. Nenhum grupo estudado apresentou tempo para valor mínimo de pressão dependente da dose de adrenalina (**Figura 32**). Quando comparados os quatro grupos entre si, houve uma tendência não significativa de a hipertensão aumentar o tempo para vasodilatação (**Figura 33**).

4.3.c.3 – Duração da resposta vasodilatadora

Figura 34: Duração da resposta vasodilatadora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Figura 35: Duração da resposta vasodilatadora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

A duração da resposta vasodilatadora está representada nas **figuras 34 e 35**. Os quatro grupos estudados não diferiram significativamente quanto à duração da resposta vasodilatadora, os grupos hipertensos, diabéticos ou não, apresentaram maiores valores de duração da resposta.

4.3.c.4 – Integral (área sob a curva) da resposta vasodilatadora

Figura 36: Integral (área sob a curva) da resposta vasodilatadora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Figura 37: Integral (área sob a curva) da resposta vasodilatadora para *adrenalina* em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

Os valores de integral (área sob a curva) para a resposta vasodilatadora a adrenalina estão apresentados nas **figuras 36 e 37**. Não houve diferença estatisticamente significativa para as curvas de integral da resposta vasodilatadora de adrenalina. Conforme ocorreu para a duração, a integral foi superior para os grupos hipertensos, diabéticos ou não.

4.3.c.5 – Integral sobre a linha de base da resposta vasodilatadora

Figura 38: Integral sobre linha de base da resposta vasodilatadora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Figura 39: Integral sobre linha de base da resposta vasodilatadora para **adrenalina** em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm.

O valor de integral sobre a linha de base para a resposta de vasodilatação apresenta valores negativos para as menores doses de adrenalina e valores positivos para as doses superiores devido à vasoconstrição que ocorre mesmo com a presença de fenilefrina na solução de Krebs. Os grupos controle, diabéticos e hipertensos-diabéticos apresentaram integral sobre linha de base com aumento significativamente dependente da dose (**Figura 38 – A, B e D**, $*p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as curvas dos grupos estudado, porém houve uma tendência dos grupos diabéticos e hipertensos apresentarem maior valor de integral sobre linha de base (**Figura 39**).

4.3.d – Comparação entre vasoconstrição provocada por adrenalina e felipressina

4.3.d.1 – Diferença de pressão máxima por vasoconstrição

Figura 40: Comparação das curvas dose-resposta de diferença pressão máxima causada por vasoconstrição após exposição a **adrenalina** e **felipressina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. *p<0,05

Os valores máximos de pressão obtidos decorrentes da vasoconstrição de exposição do leito arterial mesentérico a adrenalina foram significativamente superiores àqueles da felipressina para os quatro grupos estudados: controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos (**Figura 40**, *p<0,05).

4.3.d.2 – Duração da resposta vasoconstritora

Figura 41: Comparação da duração das respostas vasoconstritoras para *adrenalina* e *felipressina* em leito arterial mesentérico deratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

A **figura 41** apresenta as durações das respostas vasoconstritoras de adrenalina e felipressina: apenas os grupos controle e hipertensos-diabéticos apresentaram maior duração de vasoconstrição por felipressina quando comparada a adrenalina (**A e D**, * $p < 0,05$).

4.3.d.3 – Integral (área sob a curva) da resposta vasoconstritora

Figura 42: Comparação da integral (área sob a curva) das respostas vasoconstritoras para *adrenalina* e *felypressina* em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Os valores de integral da resposta vasoconstritora para felypressina foram todos superiores àqueles para adrenalina (**Figura 42**), o que se relaciona com a duração da resposta (**Figura 41**). Apenas os grupos hipertensos e hipertensos-diabéticos apresentaram integral da vasoconstrição por felypressina significativamente superior a adrenalina (**Figura 42 - C e D**).

4.3.d.4 – Integral sobre linha de base da resposta vasoconstritora

Figura 43: Comparação da integral sobre linha de base das respostas vasoconstritoras para **adrenalina** e **felypressina** em leito arterial mesentérico de ratos controle (A), diabéticos (B), hipertensos (C) e hipertensos-diabéticos (D). Número de animais entre parêntesis (n). Média $\pm$ epm. * $p < 0,05$

Os valores de integral sobre a linha de base da resposta vasoconstritora para adrenalina já se aproximaram mais dos valores para felypressina, inclusive superando no grupo hipertenso-diabético (**Figura 43-D**). Este fato demonstra a importância da duração quando a integral engloba os valores basais de pressão do leito arterial mesentérico. Apenas o grupo hipertenso-diabético apresentou integral sobre linha de base da vasoconstrição por adrenalina significativamente superior a felypressina (**Figura 43 - D**).

4.4 –Quantificação relativa da expressão gênica de receptores em leito arterial mesentérico

4.4.a –Quantificação relativa da expressão gênica (RNA_m) do Receptor α_{1A} -adrenérgico

Figura 44: Quantificação relativa para RNA_m de receptor α_{1A} -adrenérgico em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * $p<0,05$

A quantificação relativa da presença de RNA_m que codifica o receptor α_{1A} -adrenérgico em leito arterial mesentérico apresentou-se significativamente aumentada para os grupos diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos quando comparados ao grupo controle ($p<0,05$). As variações entre os grupos experimentais não foi significativa

4.4.b –Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor β_2 -adrenérgico

Figura 45: Quantificação relativa para RNAm de receptor β_2 -adrenérgico em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n).

A quantificação relativa do receptor β_2 -adrenérgico em leito arterial mesentérico de ratos apresentou-se inalterada para os quatro grupos estudados. Houve uma tendência não significativa de a associação da diabetes com a hipertensão reduzir a expressão deste gene responsável pela vasodilatação provocada pela adrenalina.

4.4.c –Quantificação relativa da expressão gênica (RNA_m) do Receptor V_{1A} para vasopressina

Figura 46: Quantificação relativa para RNA_m de receptor V_{1A} para vasopressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n).

Não houve variação significativa para a expressão gênica do receptor V_{1A} para vasopressina em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos.

4.4.d –Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor AT_{1A} para angiotensina II

Figura 47: Quantificação relativa para RNAm de receptor AT_{1A} para angiotensina II em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * $p < 0,05$

A Figura 47 mostra a quantificação relativa da presença de RNAm do receptor AT_{1A} para angiotensina II em ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Houve um aumento estatisticamente significativo da expressão gênica deste receptor nos grupos diabéticos e hipertensos-diabéticos ($p < 0,05$). Aparentemente, a hipertensão arterial amplifica o aumento de expressão provocado pelo diabetes, porém não houve diferença significativa entre estes dois grupos.

4.4.e –Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor AT_{1B} para angiotensina II

Figura 48: Quantificação relativa para RNAm de receptor AT_{1B} para angiotensina II em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * p<0,05

Observa-se na Figura 48 que a quantidade relativa de RNAm do receptor AT_{1B} para angiotensina II em ratos é significativamente aumentada na presença de diabetes associado ou não à hipertensão (p<0,05). Houve grande variação individual nos grupos estudados, chegando a apresentar quantidade relativa de expressão gênica quinze vezes superior ao grupo controle.

4.4.f –Quantificação relativa da expressão gênica (RNAm) do Receptor AT_2 para angiotensina II

Figura 49: Quantificação relativa para RNAm de receptor AT_2 para angiotensina II em leito arterial mesentérico de ratos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Número de animais entre parêntesis (n). * $p < 0,05$

A Figura 49 apresenta a quantidade relativa de RNAm do receptor AT_2 para angiotensina II entre os grupos de rato controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos. Os ratos diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos apresentaram expressão gênica para este receptor significativamente superior ao grupo controle ($p < 0,05$).

5 Discussão

5. DISCUSSÃO

Anestésicos locais são medicamentos de estreita faixa terapêutica, ou seja, existe pequena diferença entre a concentração sanguínea mínima em que são observados os efeitos terapêuticos e a máxima em que os benefícios terapêuticos são observados sem a presença de efeitos tóxicos. As soluções anestésicas locais, principalmente com maiores concentrações, como articaína ou prilocaína 4%, podem causar efeitos adversos locais, como neurotoxicidade. Os efeitos colaterais locais se devem à irritação própria da solução, necrose isquêmica por excesso de volume ou vasoconstrição causada pelo vasoconstritor adicionado à solução. Porém a absorção para a corrente sanguínea, com ações cardíacas e demais efeitos sistêmicos são os mais preocupantes, havendo correlação entre a concentração sanguínea dos anestésicos locais e a magnitude dos efeitos colaterais. Inicialmente, pode-se usar essas moléculas para controle de arritmias cardíacas e convulsões, porém a partir de 5µg/ml os efeitos passam a apresentar risco à vida do paciente com parestesia, vertigem, convulsões, coma, parada cardíaca e respiratória (BECKER, 2014).

A associação de vasoconstritores tem o efeito de contrapor a vasodilatação causada pelos anestésicos locais, além de aumentar a permanência da solução anestésica em contato com o nervo a ser bloqueado. Com a vasoconstrição, a absorção dos anestésicos locais pelos vasos sanguíneos da área seria mais lenta e gradual, garantindo que a concentração plasmática seja menor e, ao mesmo tempo, equilibrada com o metabolismo hepático e a excreção destas drogas. O resultado final consiste na diminuição dos efeitos tóxicos dos anestésicos locais, incluindo a vantagem dos vasoconstritores diminuírem o sangramento durante a cirurgia (MEECHAN; ROBB; SEYMOUR, 1998).

Uma importante consideração é que um tubete de anestésico associado a vasoconstritor dura cerca de três vezes mais do que a anestesia promovida por um tubete de anestésico local isolado. Um estudo duplo cego sobre anestesia pulpar com diferentes doses de adrenalina associadas à lidocaína e lidocaína isolada demonstraram que a presença de vasoconstritor aumenta significativamente a duração da anestesia e o controle da dor quando a pulpa foi estimulado eletricamente (KNOLL-KOLLER, 1992). Para infiltrações maxilares a presença de vasoconstritor também aumentou significativamente a duração e qualidade da

anestesia quando se comparou solução anestésica contendo prilocaína 4% associada à adrenalina 1:200.000 ou lidocaína 2% com adrenalina 1:100.000 com prilocaína 4% isolada (KATZ, 2010). Estudos demonstram que a presença de adrenalina em solução anestésica de lidocaína reduz a necessidade de maior número de aplicações para anestesia raquidianas em cesarianas (XYLESTESIN, 2016).

As drogas vasoconstritoras, porém, apesar de apresentar o papel de diminuir o calibre dos vasos e retardar a absorção sistêmica dos anestésicos locais, serão também absorvidas pela corrente sanguínea e distribuídas para todos os tecidos. Em estudo com pacientes saudáveis, a infiltração de solução anestésica local contendo adrenalina aumentou os valores de frequência cardíaca e concentração plasmática de adrenalina quando comparada a solução sem a presença de vasoconstritor (SALONEN, 1988). Os vasoconstritores de maneira geral têm como efeito colateral a própria vasoconstrição de outros leitos arteriais quando absorvidos e distribuídos pelo corpo, aumentando a resistência periférica ao fluxo de sangue e, muitas vezes, diminuindo o aporte sanguíneo para determinados tecidos. Tais fatos poderiam ser preocupantes, especialmente nos pacientes portadores de doenças cardiovasculares: hipertensão, diabetes mellitus, doenças vasculares cerebrais isquêmicas, isquemia miocárdica, insuficiência renal, insuficiência cardíaca, doenças ateroscleróticas, entre tantos outros. Algumas soluções anestésicas comercialmente utilizadas colocam a hipertensão como contraindicação ao uso de lidocaína associada à noradrenalina (ALPHACAINE, 2016).

A maior parte dos vasoconstritores disponíveis no mercado são agonistas adrenérgicos, ativando principalmente os receptores α_1 -adrenérgicos. Contudo por serem moléculas endógenas ou análogas há maior probabilidade de efeitos colaterais, pois os receptores adrenérgicos são amplamente distribuídos pelo corpo, e uma molécula com a qual tenha afinidade tem mais chances de encontrá-lo ao distribuir-se pelos tecidos. O sistema nervoso simpático está envolvido em uma gama de sinalizações endógenas descritas como reação de alarme (COOPER, 2008): vasoconstrição periférica, dilatação dos brônquios, aumento da frequência e da força de contração da musculatura miocárdica, hiperglicemia e dilatação dos vasos responsáveis pela nutrição da musculatura esquelética, dentre outros efeitos sistêmicos (RANG et al., 2004b).

Nosso estudo teve objetivo de comparar os efeitos vasculares de duas drogas vasoconstritoras, uma agonista adrenérgica e outra não adrenérgica, em modelos animais de diabetes mellitus e hipertensão arterial associadas ou não, para aumentar o conhecimento sobre os vasoconstritores, bem como estudar as possíveis alterações que essas doenças poderiam causar na expressão de RNAm de seus receptores nos leitos vasculares. É necessário esclarecer os efeitos colaterais dos vasoconstritores e compará-los quanto à sua eficácia para que a decisão sobre o uso de soluções anestésicas locais com vasoconstritores seja embasada cientificamente, evitando o grande número de tubetes sem vasoconstritor que seria necessário para um procedimento odontológico mais prolongado, reduzindo assim a absorção e as altas concentrações sanguíneas de anestésicos locais em pacientes com doenças que afetem o sistema cardiovascular. Dentre os efeitos colaterais mais frequentes aos anestésicos locais, a superdosagem é responsável pelas principais e mais graves ocorrências nos consultórios (BECKER, 2014).

Nos dados basais foi possível observar que a pressão arterial média, sistólica e diastólica foi significativamente diferente nos grupos de animais hipertensos 1R-1C e 1R1C-diabéticos em relação aos grupos normotensos e diabéticos. Fato interessante a ser notado é que o grupo de animais onde as duas patologias foram associadas não apresentou níveis mais elevados de pressão arterial do que os ratos apenas hipertensos. Sabe-se que o diabetes é grande fator de risco para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares, notadamente nos indivíduos já portadores de hipertensão. Nossos dados mostraram que, ao menos os níveis de pressão arterial sistólica, média e diastólica, não foram elevados pela concomitância dos dois processos. Percebe-se também que, nos grupos induzidos ao diabetes mellitus, a pressão arterial foi ligeiramente inferior àquela registrada nos grupos não diabéticos, sem haver, contudo, diferença estatisticamente significativa. Pode-se imaginar possível inferência entre ambos os modelos experimentais utilizados neste trabalho: a hipertensão arterial, segundo modelo de Goldblatt e o diabetes mellitus, induzido pela injeção de estreptozotocina.

O modelo um-rim, um clip (1R-1C) idealizado por Goldblatt na década de 50, é inicialmente dependente da renina liberada pelos rins. A instalação do “clip” de prata com abertura de 0,25 mm na artéria renal esquerda e a remoção cirúrgica do rim contralateral faz com que a taxa de filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal

sejam bastante reduzidos, inicialmente. Como resposta a esses eventos, o rim remanescente libera renina, enzima que promove a conversão do angiotensinogênio plasmático em angiotensina I. Este peptídeo, por sua vez, sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), é transformado em angiotensina II, um potente agente vasoconstritor que exerce forte ação constritora sobre a arteríola eferente renal, aumentando assim a pressão de filtração no glomérulo. Com a constrição da arteríola eferente, ocorre grande redução do fluxo sanguíneo pelos capilares peritubulares, o que aumenta a reabsorção de sódio e água. Desta maneira, com a retenção de líquido, este modelo de hipertensão experimental passa a ser volume-dependente, pois a filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal são normalizados às custas do aumento de volume líquido corporal e do aumento da pressão arterial sistêmica (FARIA, 1990; FARIA; SALGADO, 1992). Trata-se, portanto, de um modelo experimental de hipertensão secundária cujo preparo é relativamente fácil e custo baixo, que se aproxima bastante da hipertensão essencial humana (LEENEN; MYERS, 1984). Este modelo é especialmente interessante para medidas de expressão de receptores tanto das moléculas vasoconstritoras estudadas quanto dos receptores das moléculas do sistema renina-angiotensina, pois não há alteração genética para desencadear a hipertensão arterial, ou seja, os grupos experimentais são isogênicos com os grupos controle, portanto apenas o mecanismo de desenvolvimento e a instalação da hipertensão arterial e do diabetes estudado levam às alterações observadas na quantificação de RNAm dos receptores α_1 e β_2 – adrenérgicos, V_{1A} para felipressina AT-1 e AT-2 para angiotensina II.

Em contrapartida, a injeção de estreptozotocina causa a morte das células β pancreáticas em quantidade significativa, levando a forte hiperglicemia que se assemelha ao *diabetes mellitus* tipo I. Em decorrência da forte hiperglicemia, há também glicosúria neste modelo, graças à grande filtração glomerular e baixa reabsorção de glicose pelos túbulos renais. Devido à glicosúria o volume de urina aumenta, compensando relativamente a retenção de líquido promovida pela sinalização decorrente da cirurgia de implantação do “clip” de prata. Contudo, esta compensação se restringe pela lesão glomerular que a hiperglicemia constante causa no rim remanescente (UTIMURA et al., 2003).

Outra diferença significativa encontrada entre os valores basais foi a glicemia elevada nos grupos diabéticos e 1R1C-diabéticos, conforme esperado, e o peso significativamente inferior nos grupos hipertensos e hipertensos-diabéticos

quando comparados com os grupos controle e diabéticos. A hipertensão renal 1R-1C foi demonstrada como fator capaz de afetar o desenvolvimento de ratos Wistar (FARIA, 1990). Porém, não foi observada diferença do peso dos animais diabéticos com o grupo controle, o que foi observado em estudo anterior do nosso laboratório (FLEURY, 2012). Esta variação provavelmente está relacionada com a alteração da origem do ratos Wistar fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP) que anteriormente eram reproduzidos na própria unidade e para o presente trabalho passaram a ser abastecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). De maneira geral o peso dos animais da FMRP-USP foi maior e mais homogêneo que os anteriores, o que dificulta a comparação entre os dados anteriores do laboratório, de pressão arterial direta e os de reatividade vascular do leito arterial mesentérico.

Adrenalina e noradrenalina se diferenciam pela menor afinidade da última pelos receptores β_2 -adrenérgicos, envolvidos na vasodilatação principalmente dos músculos esqueléticos e broncodilatação. Em compensação, a noradrenalina apresenta alta afinidade pelos receptores β_1 -adrenérgicos presentes principalmente no coração promovendo aumento da força de contração e frequência cardíaca. Para pacientes portadores de doenças cardiovasculares, a utilização de noradrenalina associada a anestésicos locais é contraindicada (LITTLE, 2000).

A potência vasoconstritora da adrenalina foi confirmada em nosso estudo pelos picos de aumento de pressão registrados na pressão de perfusão do leito arterial mesentérico após a exposição das doses de adrenalina estudadas (Figura 3). Observa-se que a vasoconstrição aumentou significativamente conforme maior a dose de adrenalina utilizada (figuras 10 e 11). Ligando-se aos receptores β_2 , a adrenalina também produz efeito vasodilatador e com isso, a redução de pressão arterial, causada especialmente pela diminuição da resistência periférica. Na concentração fisiológica de adrenalina, leitos vasculares contendo receptores do tipo α_1 e β_2 apresentam predomínio da ação vasodilatadora, porém, com o aumento da concentração plasmática da adrenalina, passa a haver maior resposta vasoconstritora, ativando os receptores α_1 (HOFFMAN, 2005). Este comportamento foi observado neste estudo, apesar de o valor mínimo de pressão só haver variado significativamente com as doses no grupo dos hipertensos; para os outros grupos a integral sobre a linha de base que demonstra a resposta de maneira mais global

comportou-se significativa e inversamente proporcional às doses de adrenalina (figuras 20 e 28). Na figura 4 é possível verificar que para as menores doses de adrenalina, o leito arterial mesentérico (que estava contraído pela presença de fenilefrina - 25 μ M ou 4,175 μ g/L) após administração de 80, 160 e 320ng de adrenalina mostrou resposta vasodilatadora em quase todos os grupos, porém para as doses de 640ng e 1280ng de adrenalina promoveu uma resposta predominantemente vasoconstritora, o que poderia ser explicado por maior afinidade pelos receptores α_1 -adrenérgicos e deslocamento da fenilefrina ou ocupação dos receptores não ligados.

A quantidade de adrenalina administrada em pacientes com doenças cardiovasculares também é de extrema importância, definindo seus possíveis efeitos sistêmicos. Trabalhos recentes, com base no “Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure” (JNC7, 2004), amparado pela “American Heart Association”, aconselham o uso da adrenalina como agente vasoconstritor associado aos anestésicos locais. Segundo este guia de conduta, uma dose de até 56 μ g de adrenalina poderia ser considerada segura para pacientes portadores de doenças cardiovasculares, especialmente hipertensos (HERMANN; KONZELMAN; PRISANT, 2004).

Para pacientes diabéticos ou em que o diabetes esteja associado à hipertensão não há uma conduta definida sobre o uso de vasoconstritores. As alterações vasculares que ocorrem na vigência do *diabetes mellitus* levam a importante angiopatia, tanto na micro quanto na macroestrutura do vaso (COOPER et al., 2001). Cerca de 70% dos pacientes diabéticos tipo II acabam desenvolvendo hipertensão, ao passo que aproximadamente 40% dos diabéticos tipo I também podem desenvolver processo hipertensivo (COOPER, 1998).

Não houve diferença significativa entre a vasoconstrição observada pelo valor máximo de pressão após exposição à adrenalina nos quatro grupos estudados (Figura 11), contudo, quando utilizamos a integral da resposta sobre a linha de base essa diferença passa a ser estatisticamente significativa. A integral, área sob a curva, considera todos os valores de pressão do sistema no tempo que ocorre a resposta vasoconstritora. Descontando-se os valores basais, ou pressão já inerente do sistema com leito arterial mesentérico relaxado, observamos um valor mais próximo da resposta vasoconstritora global. Desta forma, é possível afirmar que a

resposta vasoconstritora para adrenalina foi significativamente inferior para o grupo diabético e aparenta estar deslocada para a direita nos grupos hipertenso e hipertenso-diabético (Figura 19).

Um estudo com camundongos obesos, modelo geneticamente modificado para hipertrigliceridemia, induzidos para hiperglicemia e hiperglicosúria em duas faixas de valores identificou que a contração das aortas estava reduzida nos grupos diabéticos, o que foi relacionado com a menor expressão de RNAm para receptores α_1 -adrenérgicos (BUCCI, 2004). Contudo o procedimento para detecção deste estudo foi o uso da transcriptase reversa e PCR com quantidades padronizadas medidas em gel de agarose, um método não muito preciso para quantificação de RNAm quanto o PCR em tempo real utilizado neste estudo. Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, tratados ou não com dieta hipercalórica rica em frutose, apresentaram menor resposta pressora (ED_{50}) e resposta vasoconstritora a noradrenalina medida através do índice de fluxo venoso (LEUNG et al., 2010). A dieta rica em frutose aumentou a concentração sérica de triglicérides e reduziu ainda mais a vasoconstrição venosa. Existem indícios de que principalmente os episódios de hipoglicemia sejam relacionados com a neuropatia autonômica e redução de resposta de pacientes diabéticos para drogas adrenérgicas em geral (ADLER et al., 2009).

Em contrapartida, outros estudos apontam que a noradrenalina produziu contrações de maior magnitude em aortas e artérias mesentéricas de ratos diabéticos na presença de meio rico em cálcio tanto inicialmente quanto readicionado (ABEBE; HARRIS; MACLEOD, 1990). No modelo de ratos intolerantes a glicose após injeção neonatal de estreptozotocina, a contração da aorta só foi maior do que nos controles para doses máximas e submáximas de noradrenalina após readição de cálcio no meio (ABEBE and MOZAFFARI, 2007). Em camundongos este dado foi confirmado, comparando-se a contratilidade dos músculos lisos vasculares em camundongos diabéticos induzidos por haloxano com cepa resistente a essa substância: observou-se o aumento da resposta à adrenalina e nenhuma alteração para serotonina apenas nos camundongos que apresentaram hiperglicemia (ABE et al., 1998).

Um estudo sobre a reatividade vascular do antebraço em pacientes diabéticos tipo I demonstrou menor resposta vasoconstritora para sinalização do sistema nervoso autônomo simpático sem haver comprometimento da atividade

nervosa (VAN GURP et al., 2006). Os resultados obtidos confirmam estes dados, já que o modelo utilizado aproxima-se mais do diabetes tipo 1 observada em seres humanos. Já para o diabetes tipo 2 e quadro de tolerância a glicemia, a reatividade vascular do antebraço para noradrenalina está aumentada quando comparada com indivíduos obesos não-diabéticos (SIVITZ et al., 2007).

Na hipertensão essencial humana parece haver marcante hiperatividade simpática, sendo a desnervação simpática do rim uma possível abordagem a ser utilizada no tratamento da hipertensão resistente, em que a terapia medicamentosa tenha falhado (ESLER et al., 2010). O desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial podem ter relação com alterações da produção, armazenamento e metabolismo das catecolaminas endógenas (CURRIE et al., 2011). Estudo com jovens hipertensos demonstrou que situações de estresse podem levar a maior descarga de noradrenalina dos neurônios cerebrais simpáticos, o que resulta em maiores concentrações de noradrenalina no plasma (ESLER et al., 1991). Em estudos com leitos arteriais mesentéricos isolados de animais 1R-1C observou-se maior sensibilidade à noradrenalina administrada de forma exógena, sendo esses resultados atribuídos a um possível aumento de espessura da parede muscular das artérias e arteríolas (FARIA, 1990). A transmissão noradrenérgica também poderia estar alterada em modelos experimentais como o da hipertensão 1R-1C, possivelmente pela atuação da angiotensina II gerada localmente, facilitando a liberação do transmissor ou potencializando a resposta pós-sináptica (FARIA; SALGADO, 1992). Este fato sugere maior potência de vasoconstrição para adrenalina observada nos grupos hipertensos e hipertensos-diabéticos, em que os valores máximos parecem estar além da dose de 1280ng.

Armenia et al. (2008) estudaram as respostas do fluxo sanguíneo renal após estimulação elétrica e injeções de agonistas adrenérgicos, na presença ou não de antagonistas deste sistema, empregando o modelo experimental da hipertensão 2R-1C, induzidos ou não ao diabetes por injeções de estreptozotocina. Seus resultados mostraram que os receptores α_{1a} são aqueles mais envolvidos com a resposta simpática vasoconstritora renal nos ratos simultaneamente diabéticos e hipertensos.

Um estudo realizado em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e espontaneamente hipertensos (linhagem geneticamente alterada, SHR), testou a reatividade vascular à noradrenalina em ratos descerebrados (pithedrats) após

vagotomia e simpatectomia bilateral, e obteve como resultado a diminuição da resposta vasoconstritora após injeções intravenosas de noradrenalina nos animais diabéticos e hipertensos-diabéticos (HONG; HUANG; VILLAFANÍA, 2010). O presente estudo mostrou resultados diferentes, uma vez que o diabetes isolado levou a menor resposta vasoconstritora à adrenalina e a associação com a hipertensão deslocou a curva de integral sobre a linha de base para direita, mas aparentemente potencializou a vasoconstrição aumentando a ED₅₀, uma vez que a dose 1280ng de adrenalina não representa o valor máximo de vasoconstrição integral encontrada. Contudo, devemos enfatizar que os modelos de hipertensão utilizados e as drogas vasoconstritoras foram diferentes, além do tempo de indução do diabetes que, no caso de Hong e colaboradores (2010) foi de 4 semanas, enquanto que nosso estudo utilizou período menor (2 semanas). Além disso, nosso estudo foi em órgão isolado, ao contrário do estudo de Hong e colaboradores.

O tempo para a vasoconstrição máxima produzida pela adrenalina também foi afetado devido à sua exposição a uma situação de hipertensão e diabetes (**Figuras 12 e 13**). Os grupos experimentais aumentaram significativamente o tempo que demorou para atingir a pressão máxima de resistência vascular quando comparados ao grupo controle (**Figura 13**). A adrenalina atingiu o ponto máximo assim que entrava em contato com o leito arterial mesentérico, sendo o tempo esperado entre a injeção no sistema e o máximo valor de pressão de perfusão praticamente equivalente ao tempo que demorava para a dose ser perfundida até a jaqueta de vidro. Essa alteração pode ser explicada pelas alterações do endotélio causadas pela hiperglicemia e produtos finais de glicosilação, formadas inespecificamente na superfície, que precedem o crescimento da camada média (hipertrofia da porção muscular), aumentando seu diâmetro e resistência, conforme demonstrado na diabetes experimental no leito mesentérico de ratos (RUMBLE et al., 1997).

A duração da resposta vasoconstritora, assim como a integral (área sob a curva) aumentaram significativamente de maneira dependente da dose de adrenalina aplicada (**Figuras 14 e 16**) e os grupos experimentais apresentaram valores significativamente inferiores quando comparado ao grupo controle (**Figuras 15 e 17**). Quando consideramos a integral sem excluir os valores inferiores à linha de base temos um valor muito mais relacionado à duração do que ao aumento de pressão do sistema gerado pela vasoconstrição. Isso porque o

tempo multiplicado pelo valor basal de pressão de perfusão do leito arterial mesentérico relaxado é maior que a pressão pela duração da resposta, principalmente para curtas durações como a resposta da adrenalina, com formato de picos.

Para a vasodilatação provocada por adrenalina (**Figuras 30 e 31**) houve uma tendência não significativa de o diabetes e a hipertensão reduzirem a resposta vasodilatadora, contudo quando associadas as duas doenças se manteve tão claramente esta tendência. Um dos principais motivos para a falta de diferenças estatisticamente significativas é o baixo número de animais utilizado nos experimentos ($n=5$). Outro fator a se considerar é a menor presença de receptores β_2 -adrenérgicos no leito arterial mesentérico, uma vez que este leito representa a irrigação dos órgãos do aparelho digestivo que tendem a apresentar maior vasoconstrição na sinalização simpática. Poucos estudos avaliam a resposta desta região quando se utiliza drogas simpatomiméticas. Segundo resultados anteriores do Laboratório de Farmacologia da FOB-USP era esperada a redução da resposta vasodilatadora para o grupo diabético, porém não para o grupo hipertenso (FLEURY, 2012). O grupo hipertenso-diabético comportou-se semelhantemente ao grupo hipertenso não diabético quanto à resposta vasoconstritora (**Figura 19**) e muito próximo aos resultados do grupo controle quanto à resposta vasodilatadora (**Figuras 31 e 39**). Esperava-se uma redução da resposta vasodilatadora do grupo hipertenso-diabético semelhante ao grupo diabético devido a resultados anteriores que demonstraram a menor resposta hipotensora da adrenalina nesse grupo. Um estudo em que se avalia a variação da pressão arterial após injeção intravascular de adrenalina observou uma maior resposta de diminuição de pressão para o grupo hipertenso, portanto era esperado que o grupo hipertenso apresentasse vasodilatação igual ou maior que o controle, o que não ocorreu no presente trabalho (FLEURY et al., 2015).

A expressão e atividade dos receptores β -adrenérgicos estão alteradas em coração de ratos diabéticos: os receptores β_1 -adrenérgicos apresentam menor distribuição na membrana plasmática do miocárdio de modelos experimentais de diabetes, os receptores β_2 -adrenérgicos apresentam menor concentração e menor acoplamento, enquanto o subtipo β_3 -adrenérgico, que apresenta atividade cronotrópica e inotrópica negativa, está normal ou expresso em maior quantidade (ALTAN et al., 2007). Este estudo correlaciona as alterações na expressão e

funcionamento dos receptores com a cardiopatia diabética que é uma das principais causas de óbito dos pacientes diabéticos. O relaxamento vascular sinalizado pela acetilcolina está também prejudicado, uma vez que há formação de radicais livres, tal como o ânion superóxido, que reage inativando o óxido nítrico, necessário para relaxamento da musculatura lisa dos vasos (DIEDERICH et al., 1994). A redução do efeito vasodilatador da adrenalina também foi observada na retina de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (NAKAZAWA et al., 2008).

O tempo para atingir a máxima vasodilatação após exposição à adrenalina do leito arterial mesentérico já contraídomostrou valores maiores do que a resposta vasoconstritora ao mesmo agente. A resposta vasodilatadora (**Figura 5**) da adrenalina apresenta um padrão mais lento e duradouro do que a vasoconstrição (**Figura 3**). A duração e a integral não variaram de acordo com a dose ou entre os grupos de maneira significativa. O valor mínimo de pressão de perfusão atingido foi dose-dependente apenas para grupo hipertenso, enquanto a integral sobre a linha de base apresentou padrão inversamente proporcional à dose de adrenalina empregada para os grupos controle, diabéticos e hipertensos-diabéticos.

Um agente vasoconstritor independente de ações adrenérgicas é a felipressina, um derivado sintético da vasopressina (*2-(L-Phenylalanine)-8-L-lysinevasopressin*). Esta substância provoca vasoconstrição por se ligar aos receptores V_{1a} para a vasopressina, largamente distribuídos pela musculatura lisa de capilares, arteríolas e vênulas. Apresenta a grande vantagem de não interagir com os receptores adrenérgicos, não aumentando desta maneira a atividade simpática (CECANHO; DE LUCA; RANALI, 2006). Quando absorvido pela corrente sanguínea, da mesma forma que a adrenalina, a felipressina também poderia provocar a constrição de outros leitos vasculares, levando aos mesmos problemas de isquemia. A felipressina apresenta estrutura polipeptídica e pode ser inativada no local da infiltração por peptidases teciduais (JACKSON, 2006). Contudo, observou-se que a infiltração de felipressina apenas elevou a pressão sanguínea em ratos quando utilizada dose equivalente ao conteúdo de 32 tubetes de solução anestésica local, o que indica muito baixa absorção dentro da quantidade normalmente utilizada em anestesia local (MORAES et al., 2015). Dados não publicados do nosso laboratório demonstram que mesmo nas doses mais altas, quando as injeções não são repetidas no mesmo animal, a felipressina infiltrada não produz aumento de pressão

arterial, o que possivelmente significa que ela não seja absorvida de maneira expressiva.

Na figura 4 é possível observar que a resposta vasoconstritora da felipressina não segue o padrão de picos bem definidos atingindo rapidamente o valor máximo como foi observado para a adrenalina, mas sim platôs de manutenção da pressão elevada. Este padrão da vasoconstrição foi observado também para a variação da pressão arterial após injeção intravascular de felipressina (FLEURY et al., 2015). O valor máximo de pressão obtido após vasoconstrição arterial por felipressina variou proporcionalmente com a dose para todos os grupos (**Figura 20**), porém não houve diferença significativa entre os grupos estudados (**Figura 21**). Contudo, o valor de integral sobre a linha de base pode esclarecer melhor o comportamento da resposta vasoconstritora e para estes dados há uma redução significativa da vasoconstrição quando se compara o grupo controle aos grupos diabético, hipertenso e hipertenso-diabético (**Figura 29**).

Não há literatura disponível sobre a vasoconstrição provocada por felipressina em leito arterial mesentérico, o que dificulta a comparação dos nossos dados. Os valores de tempo para resposta máxima, duração e integral da resposta vasoconstritora da felipressina apresentaram maiores valores do que os observados para os outros parâmetros estudados. Devido ao menor número de efeitos causados pela felipressina, seu uso em pacientes com doenças cardiovasculares poderia ser indicado, pois seriam evitados os efeitos cardíacos de aumento da frequência ou da força de contração miocárdica, além de efeitos metabólicos, como o aumento da glicemia. A adrenalina, por outro lado, agindo no coração, pode aumentar o débito cardíaco, pela elevação marcante do trabalho do coração e do consumo de oxigênio pelas células miocárdicas. Este fato acaba provocando certa redução da eficiência do trabalho cardíaco, havendo gasto maior de glicose e maior produção de radicais livres, o que indica estresse para as células miocárdicas e maior necessidade de aporte sanguíneo (HOFFMAN, 2005).

Em estudos com ratos diabéticos submetidos a choque séptico por administração de endotoxinas (LPS), demonstrou-se melhor restauração do fluxo sanguíneo arterial em aorta e rins quando se administrou vasopressina, isolada ou associada a inibidores da NO-sintase, se comparada à noradrenalina sob as mesmas condições (HINOHARA et al., 2010). Este trabalho mostra que o óxido nítrico (NO) pode ser um dos responsáveis pela redução da sensibilidade às ações

da vasopressina em leito arterial mesentérico durante o choque séptico, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Isto pode explicar a redução do efeito vasoconstritor do peptídeo análogo felipressina nos grupos diabéticos, uma vez que a produção endotelial de sinalização de NO está reduzida tanto no diabetes quanto na hipertensão arterial, além de haver maior degradação do NO produzido pelos produtos de glicosilação e aumento do estresse oxidativo na vigência do diabetes mellitus (VANHOUTTE, 2009).

Inagawa, Ichinohe e Kaneko (2010), verificaram que a felipressina injetada na língua de coelhos em associação com a prilocaína, na proporção utilizada nas soluções anestésicas odontológicas, provocou redução do fluxo sanguíneo aórtico e coronariano, além de reduzir a tensão tissular de oxigênio no miocárdio. A adrenalina, sob as mesmas condições, aumentou os fluxos sanguíneos e não produziu alteração na tensão de oxigênio do músculo cardíaco. Observa-se que a felipressina tende a contrair os vasos de maneira mais prolongada sem produzir picos de vasoconstrição, e sem efeitos diferenciados de vasodilatação dependendo do leito que atinge. Contudo, no estudo apresentado, além dos efeitos vasculares dos vasoconstritores é necessário considerar que são utilizados dois anestésicos locais diferentes.

Considerando que um tubete de anestésico local associado a adrenalina na proporção de 1:100.000 contém 18µg de vasoconstritor sendo usualmente utilizado em um ser humano adulto de 70kg (média), fizemos uma conversão para a quantidade correspondente a essa dosagem corrigindo para o peso do rato, em média 300g, e obtivemos que a quantidade presente proporcionalmente a um tubetese fosse utilizado em ratos seria de cerca de 77ng, arredondado para 80ng para fins de precisão de formulação das doses nos estudos. Desta forma, é possível considerar que as doses analisadas no presente trabalho para adrenalina, 80, 160, 320, 640 e 1280ng, correspondem ao equivalente a 1, 2, 4, 8 e 16 tubetes. Para a felipressina o mesmo cálculo foi feito, a concentração do tubete é de 0,030UI em 1,8ml, o conteúdo de vasoconstritor é de 0,054UI ou 54mUI, corrigido pelo peso temos 0,23mUI, também arredondado para 0,25mUI. As doses utilizadas neste estudo para felipressina, 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 mUI correspondem ao conteúdo presente em 1, 2, 4, 8 e 16 tubetes. Este cálculo de doses além de transformar os dados obtidos em informações mais palpáveis para os profissionais que utilizam os tubetes de anestésicos locais, também possibilita que dois vasoconstritores que apresentam

unidades de medida diferentes (mg e UI) sejam comparados pela mesma unidade de medida (Número Equivalentes de Tubetes).

A adrenalina apresentou valores máximos de pressão por aumento da resistência vascular significativamente superior à vasoconstrição por felipressinanos leitos arteriais mesentéricos dos grupos controle, diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos (**Figura 40**). Este dado representa principalmente o comportamento da resposta vasoconstritora para cada uma destas moléculas: a adrenalina produz vasoconstrição rápida com picos de aumento de pressão do sistema de perfusão (**Figura 3**), enquanto a felipressina provoca uma vasoconstrição lenta e duradoura com formação de um “platô” com valores mais baixos, porém permanentes de aumento de pressão (**Figura 5**). Devido ao comportamento diferente das duas moléculas estudadas é necessário recorrer ao valor de integral sobre a linha de base que representa a resposta vasoconstritora global (**Figura 43**): houve uma tendência não significativa de a felipressina apresentar maior integral sobre a linha de base do que a adrenalina para a maioria das doses nos grupos controle, diabético e hipertenso. Para o grupo hipertenso-diabético a resposta vasoconstritora da adrenalina foi significativamente superior à da felipressina mesmo quando analisamos a integral sobre a linha de base.

Em estudo anterior que compara os efeitos da injeção intravascular de adrenalina e felipressina sobre a pressão arterial de ratos hipertensos tratados ou não com atenolol, a resposta hipertensora não diferiu significativamente entre os dois vasoconstritores (FLEURY et al., 2015). Considerando-se que a felipressina não tem efeitos cardíacos diretos em receptores β_1 como a adrenalina, a vasoconstrição foi responsável pelo aumento da pressão arterial nos animais estudados. Sabe-se que a vasopressina apresenta meia-vida plasmática em torno de 17 a 35 minutos, portanto, espera-se que também seu análogo sintético tenha efeito prolongado nos vasos quando distribuído pela corrente sanguínea (JACKSON, 2006).

A duração e a integral da resposta vasoconstritora produzida por felipressina foram superiores às daquelas da vasoconstrição por adrenalina, sendo encontrada diferença estatisticamente significativa apenas para duração nos grupos controle e hipertenso-diabético e para integral nos grupos hipertenso e hipertenso-diabético (**Figuras 41 e 42**).

A adrenalina permanece neste estudo como vasoconstritor mais potente disponível para o uso clínico, porém não se pode descartar o uso de felipressina

para evitar efeitos colaterais com relação ao aumento de frequência cardíaca decorrente da infiltração de adrenalina mesmo nas doses usuais correspondentes ao conteúdo de dois tubetes de adrenalina na proporção de 1:100.000 (MORAES et al., 2015). Meechan et al. (1997), em estudo realizado em pacientes que sofreram transplantes cardíacos, notaram menores efeitos hemodinâmicos da felipressina, quando comparada à adrenalina. Em contrapartida, foi demonstrado que a utilização de solução de prilocaína associada à felipressina para anestesia durante tratamento periodontal em pacientes hipertensos com a pressão arterial controlada resultou no aumento da pressão arterial diastólica quando comparada à prilocaína isolada (BRONZO et al., 2013).

Jackson (2006) indica que a vasopressina pode indiretamente provocar redução do débito e da frequência cardíaca, como resultado da vasoconstrição das coronárias, com consequente redução de fluxo sanguíneo coronariano, além de promover alteração do tônus simpático e vagal. Oliveira, Gazola e Singi (2002) já haviam verificado redução significativa da frequência cardíaca de corações isolados de ratos com a dose de 1,6 UI de felipressina, além de redução da força de contração utilizando dose maior (5,5 UI). Maxwell (1965) descrevendo os efeitos cardiovasculares “in vivo” da felipressina em coração de cão, também já havia notado efeito inotrópico e cronotrópico negativo. A hipótese também levantada por Oliveira (2002) para explicar os efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos, toma por base o trabalho de Agata et al. (1999), que mostra redução de fluxo sanguíneo coronariano e diminuição da tensão tissular de oxigênio durante anestesia, em cães.

Devido à potência de vasoconstrição da adrenalina, alguns estudos apontam que a utilização de soluções anestésicas de articaína 4% contendo adrenalina na proporção de 1:200.000 ou 1:100.000 não apresentam diferença significativa sobre o controle da dor intraoperatória, duração da analgesia residual pós-operatória e quantificação de sangramento feito pelo cirurgião para extração de terceiros molares inferiores (SANTOS et al., 2007). A adrenalina é considerada o vasoconstritor de escolha para pacientes hipertensos (GLICK, 2004), contudo apenas um estudo de revisão sistemática de literatura foi realizado avaliando os efeitos cardiovasculares do uso de solução anestésica local contendo adrenalina em procedimento odontológico ou de fios de retração impregnados com adrenalina, sendo evidenciada a segurança para pacientes portadores de hipertensão arterial (BADER et al., 2002). Apesar de a revisão sistemática garantir o máximo de

evidência científica para uma decisão clínica, é necessário destacar a falta de informação disponível sobre esta questão na literatura: esta revisão sistemática coletou 406 estudos e apenas 6 foram elegíveis através dos critérios de inclusão e exclusão. Os estudos disponíveis na literatura apresentam grande heterogeneidade e impedem conclusões sobre a segurança e eficácia do uso de vasoconstritores em pacientes portadores de doenças que afetam o sistema cardiovascular. Devido ao comportamento do grupo hipertenso-diabético, podemos sugerir que a segurança da adrenalina se mantém para pacientes em que a hipertensão está associada ao diabetes.

Os experimentos de biologia molecular realizados no presente estudo compreendem as reações de transcrição reversa do RNA e reação em cadeia da polimerase (PCR) com detecção em tempo real. A transcrição reversa foi realizada com sondas de nucleotídeos contendo sequências de poli-T (timina) para anelar com a chamada cauda de poli-A (adenilato) presente no RNA mensageiro, que codifica a sequência para síntese da proteína. Na PCR foram utilizadas sondas que codificam porções entre exons dos genes estudados, desta forma, evita-se a necessidade de tratamento prévio da amostra com DNase pois o DNA genômico possui grandes sequências de introns entre os exons. A DNase pode prejudicar o rendimento da reação para amplificação dos cDNAs obtidos na transcrição reversa. Nestes experimentos é possível quantificar a expressão gênica de uma proteína, no caso do presente estudo, receptores para moléculas vasoconstritoras, relativamente a um gene de referência presente em todas as células do organismo (β -actina). Após este cálculo, a quantificação relativa é estabelecida a com relação a uma amostra de referência do grupo controle. Observa-se nos resultados (**Figuras 44 a 49**) uma grande variabilidade da quantificação relativa de RNAm nas células do leito arterial mesentérico, o que está relacionado com estado crônico dos modelos estudados (30 a 40 dias de hipertensão e 14 a 20 dias de diabetes). Quando a célula é exposta a um ambiente diferente, as alterações de expressão de genes consistem nas primeiras atividades detectadas, após a fase aguda de adaptação a célula pode entrar em estado de equilíbrio, onde a quantidade de RNAm pode não estar relacionada à quantidade de receptores presentes na membrana, nem com sua atividade fisiológica (LEHNINGER, 2014). Portanto, futuros estudos devem ser realizados com a detecção dos receptores na membrana plasmática através de imuno-histoquímica ou Western blot, além de possivelmente ser repetida a técnica

utilizada no presente trabalho em situação aguda logo após as induções para aumentar a sensibilidade.

Apesar da grande variabilidade das amostras, foi possível observar que tanto o diabetes quanto a hipertensão, associadas ou não, aumentaram significativamente a quantidade de RNAm para receptor α_{1A} -adrenérgico em células do leito arterial mesentérico de ratos (**Figura 44**). Este resultado contradiz um estudo anterior em que a expressão gênica de receptores α_1 e β_2 -adrenérgico estão reduzidos em aortas de camundongos diabéticos não obesos (NOD) em que a glicemia e a glicosúria estão entre alta ou severa (BUCCI, 2004). Este modelo apresenta uma tendência de gerar diabetes autoimune semelhantes ao diabetes tipo I e os estágios mais avançados apresentaram redução da presença de receptores na membrana medidos através de Western blot, porém a quantificação da expressão genética foi feita através da densidade ótica do produto de PCR em gel de agarose após um número padronizado de ciclos. Este método não permite quantificação apropriada de RNAm por ser impreciso, sendo o RT-PCR real time considerado o método de padrão “ouro” para a quantificação de RNAm uma vez que a luminescência é medida a cada ciclo. Deve-se levar em consideração também que os ratos utilizados no presente estudo são isogênicos e que a indução exógena do diabetes e da hipertensão foram responsáveis pelas alterações no padrão de expressão genética, enquanto a maioria dos estudos disponíveis na literatura utilizam animais geneticamente modificados como modelos, podendo a própria alteração genética experimental da doença levar a alterações não relacionadas à hiperglicemia ou aumento de pressão nas artérias.

Ocorreu uma tendência não significativa de tanto a hipertensão quanto o diabetes, principalmente quando associados, reduzirem a quantidade relativa de RNAm de receptores β_2 -adrenérgicos em leito arterial mesentérico de ratos (**Figura 45**). Além da grande variabilidade, uma possível justificativa para esse resultado é que o leito arterial mesentérico caracteriza-se por ser constituído por vasos de resistência que irrigam órgãos, e os receptores β_2 -adrenérgicos concentram-se em vasos que irrigam músculos esqueléticos ou em vasos de grande calibre como a aorta. Não existem estudos na literatura relacionando ambas as doenças estudadas com a expressão genética do receptor V_{1A} para vasopressina. O presente estudo identificou uma tendência não significativa de o diabetes reduzir a quantidade de

RNA_m para este receptor nas células do leito arterial mesentérico de ratos diabéticos, tanto normo como hipertensos (**Figura 46**).

Os resultados mais interessantes do presente trabalho consistem na expressão gênica dos receptores de angiotensina AT_{1A}, AT_{1B} e AT₂: todos os grupos de estudo apresentaram aumento significativo da quantidade de RNA_m codificando estes receptores nas artérias mesentéricas quando comparados ao grupo controle, excetuando-se o receptor AT_{1A} no grupo hipertenso (respectivamente, **figuras 47, 48 e 49**). As diferenças de quantidade relativa chegam a ser 15 vezes maiores nos grupos diabéticos e hipertensos-diabéticos. Estes dados confirmam estudos anteriores em que o diabetes e a hipertensão aumentaram a expressão gênica e quantidade de receptores AT₁ para angiotensina, enquanto apenas a associação das duas doenças resultou na superexpressão do receptor AT₂(ROMERO-NAVA, 2016). Os modelos utilizados neste caso foram a indução de diabetes por estreptozotocina intraperitoneal e a cepa de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Contudo, o aumento desta população de receptores resulta em menor efeito biológico destas moléculas, o que foi confirmado pelo presente estudo devido à tendência dos leitos arteriais mesentéricos de rato diabéticos reduzirem a resposta global à adrenalina (integral sobre baseline, **Figura 19**). Porém a associação de ambas as doenças parece ter um efeito potencializador aumentando a resposta máxima de vasoconstrição, o que pode estar relacionado tanto com a maior disponibilidade de receptores α_{1A} -adrenérgico quanto à sensibilização produzida pela angiotensina II, cujos receptores também estão com sua expressão significativamente aumentada.

O metabolismo e sinalização de moléculas do sistema renina-angiotensina-aldosterona(em inglês, a sigla RAAS é utilizada) está aumentado no diabetes *mellitus*, o que explica que a inclusão de inibidores desses receptores na terapia anti-hipertensiva de pacientes diabéticos promovam benefícios através de mecanismos tanto dependentes quanto independentes da pressão arterial (COOPER, 2004). Em modelos animais o uso de inibidores de ECA ou bloqueadores de receptores AT₁ para angiotensina II reduziu a aterosclerose independentemente dos valores de pressão arterial. A angiotensina II também apresenta efeito direto sobre o coração aumentando a hipertrofia ventricular esquerda. Um estudo com ratos diabéticos mostrou que o tratamento de aortas com angiotensina I resultou em maior formação de componentes prejudiciais do sistema

RAAS(angiotensina II e III) preferencialmente aos metabólitos protetores (angiotensina IV, 1-7 e 1-9) (WOLKOW, 2016).

Em odontologia, a importância dos achados de expressão dos receptores de angiotensina é que podem ser mais um fator relacionado à tendência de pacientes diabéticos desenvolverem doença periodontal. Estudos demonstram que o aumento da sinalização do sistema renina-angiotensina está relacionado ao desenvolvimento de periodontite (SANTOS, 2015). Desta forma, a maior quantidade de receptores AT₁ para angiotensina II no tecido periodontal devido principalmente à hiperglicemia pode contribuir junto com os produtos de glicosilação e redução da resposta imunológica imediata para a inflamação e desorganização deste tecido.

6 Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- 1) Tanto adrenalina quanto felipressina apresentaram vasoconstrição global (integral sobre linha de base) reduzida nos grupos experimentais (diabéticos, hipertensos e hipertensos-diabéticos) quando comparada com o grupo controle normotenso. Isto sugere que a utilização de vasoconstritores seria ainda mais segura em pacientes portadores de diabetes e/ou hipertensão arterial. Contudo, a expressão gênica dos receptores α_{1A} -adrenérgicos não explica este fenômeno, uma vez que se encontra aumentada nos grupos experimentais, sendo necessária confirmação em estudos de Western-blot ou ligação nos receptores de membrana.
- 2) Quando comparadas as respostas vasoconstritoras da adrenalina e felipressina, fica evidente a maior potência da adrenalina sobre a felipressina para contrair a vasculatura arterial mesentérica para todos os grupos. Contudo, considerando a maior duração da vasoconstrição em todas as doses para felipressina, a resposta vasoconstritora global foi muito próxima para ambos os vasoconstritores.
- 3) A resposta vasodilatadora a adrenalina ficou pouco evidente no leito arterial mesentérico, sendo observadas apenas tendências não significativas de tanto o diabetes quanto a hipertensão isoladas reduzirem a vasodilatação.
- 4) Ambas as doenças estudadas isoladas ou associadas induziram aumento da expressão de receptores AT_{1B} e AT_2 para angiotensina II, enquanto o diabetes, mas não a hipertensão isolada, resultou no aumento de expressão de receptores AT_{1A} . A maior expressão destes receptores significa maior sinalização do sistema nervoso simpático, o que parece potencializar a resposta máxima da adrenalina quando o diabetes está associado à hipertensão arterial porém deslocando a curva dose-resposta para a direita.

Referências

REFERÊNCIAS

Abe A, Kawazoe C, Kondo Y, Sato K. Vascular responsiveness in alloxan-induced diabetes-susceptible (ALS) and resistant (ALR) mice. *J Vet Med Sci*. 1998;60(10):1119-25.

Abebe W, Harris KH, MacLeod KM. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J CardiovascPharmacol*. 1990;16(2):239-48.

Abebe W, Mozaffari MS. Vascular reactivity changes in glucose-intolerant rat. *J CardiovascPharmacol*. 2007;50(5):590-7.

Adler GK, Bonyhay I, Failing H, Waring E, Dotson S, Freeman R. Antecedent hypoglycemia impairs autonomic cardiovascular function: implications for rigorous glycemic control. *Diabetes*. 2009;58(2):360-6.

Agata H, Ichinohe T, Kaneko Y. Felypressin-induced reduction in coronary blood flow and myocardial tissue oxygen tension during anesthesia in dogs. *Can J Anaesthesiol* 1999;46:1070–5.

Altan VM, Arioglu E, Guner S, Ozcelikay AT. The influence of diabetes on cardiac beta-adrenoceptor subtypes. *Heart Fail Rev*. 2007;12(1):58-65.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2008;31(Supl.1):12-54.

American Diabetes Association (a). 8. Cardiovascular Disease and Risk Management. *Diabetes Care*. 2016;39 Suppl 1:S60-71.

American Diabetes Association (b). 9. Microvascular Complications and Foot Care. *Diabetes Care*. 2016;39 Suppl 1:S72-80.

Armenia A, Sattar MA, Abdullah NA, Khan MA, Johns EJ. Functional subtypes of renal alpha1-adrenoceptor in diabetic and non-diabetic 2K1C Goldblattrenovascular hypertension. *ActaPharmacol Sin*. 2008;29(5):564-72.

Bader JD, Bonito AJ, Shugars DA. A systematic review of cardiovascular effects of epinephrine on hypertensive dental patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod* 2002;93:647–53.

Balser JR. The molecular interaction between local anesthetic/antiarrhythmic agents and voltage-gated sodium channels. *Trends Cardiovasc Med*. 1998;8(2):83-8.

Becker DE. Adverse drug reactions in dental practice. *AnesthProg*. 2014;61:26-33; quiz 4.

Brown RS, Rhodus NL. Epinephrine and local anesthesia revisited. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod*. 2005;100:401-8.

Brondum E, Kold-Petersen H, Nilsson H, Flyvbjerg A, Aalkjaer C. Increased contractility to noradrenaline and normal endothelial function in mesenteric small arteries from the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. *J Physiol Sci*. 2008;58(5):333-9.

Bucci M, Roviezzo F, Brancialeone V, Lin MI, Di Lorenzo A, Cicala C, et al. Diabetic mouse angiopathy is linked to progressive sympathetic receptor deletion coupled to an enhanced caveolin-1 expression. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 2004;24(4):721-6.

Catterall WA, Mackie K. Local Anesthetics. In Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006, p. 369-86.

Cecanho R, De Luca LA Jr, Ranali J. Cardiovascular effects of felypressin. *AnesthProg*. 2006;53(4):119-25.

Cooper ME. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*. 1998;352(9123):213-9.

Cooper ME, Bonnet F, Oldfield M, Jandeleit-Dahm K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. *Am J Hypertens*. 2001;14(5 Pt 1):475-86.

Cooper ME. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *Am J Hypertens*. 2004 Nov;17(11 Pt 2):16S-20S; quiz A2-4.

Cooper SJ. From Claude Bernard to Walter Cannon: Emergence of the concept of homeostasis. *Appetite*. 2008;51:419-27.

Covino BG. Toxicity of local anesthetic agents. *Acta Anaesthesiol Belg.* 1988;39(3 Suppl 2):159-64.

Currie G, Freel EM, Perry CG, Dominiczak AF. Disorders of Blood Pressure Regulation: Role of Catecholamine Biosynthesis, Release, and Metabolism. *Curr Hypertens Rep.* In Press 2011.

Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol.* 1994;266(3 Pt 2):H1153-61.

Esler M, Ferrier C, Lambert G, Eisenhofer G, Cox H, Jennings G. Biochemical evidence of sympathetic hyperactivity in human hypertension. *Hypertension.* 1991;17(4 Suppl):III29-35.

Esler MD, Krum H, Sobotka PA, Schlaich MP, Schmieder RE, Böhm M, et al. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2010;376(9756):1903-9.

Faria, FAC. Interação entre a angiotensina e o sistema nervoso simpático periférico na hipertensão um-rim, um clip [Tese]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP/USP. 1990.

Faria FAC, Salgado MCO. Facilitation of noradrenergic transmission by angiotensin in hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 19(suppl II):II-30-II-35.

Faria FAC, Ishikiriama BLC, Santos CF. Manejo da dor na dentística restauradora. In Pereira JC, Anauate-Netto C, Gonçalves SA. *Dentística: uma abordagem multidisciplinar.* Ed. Artes Médicas, São Paulo, 2014.

Fleury CA. Avaliação dos efeitos da injeção intravascular de drogas vasoconstrictoras, presentes nas soluções anestésicas locais, sobre a pressão arterial e glicemia de ratos normotensos, diabéticos, hipertensos renais um-rim, um clip (1R-1C) e 1R-1C diabéticos [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB/USP. 2012.

Fleury CA, Andreo VC, Lomba PC, Dionísio TJ, Amaral SL, Santos CF, et al. Comparison of epinephrine and felypressin pressure effects in 1K1C hypertensive rats treated or not with atenolol. *J Anesth.* 2015;29(1):56-64.

Ferrer M, Marín J, Balfagón G. Diabetes alters neuronal nitric oxide release from rat mesenteric arteries: Role of protein kinase C. *Life Science* 2000; 66(4):337-345.

Glick M. The new blood pressure guidelines: a digest. J Am Dent Assoc. 2004 May;135(5):585-6.

Guyton AC, Hall JE (a). Somatic Sensations: II Pain, Headache, and Thermal Sensations. In Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology, 11th ed. New York: Elsevier Saunders 2006.

Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. Am J Physiol. 1991; 261(4 Pt 2):H1086-94.

Herman WW, Konzelman JL. Angina: an update for dentistry. J Am Dent Assoc 1996;127;98-104.

Herman WW, Konzelman Jr JL, Prisant LM. New national guidelines on hypertension: A summary for dentistry. JADA. 2004;135:576-84

Hinohara H, Kadoi Y, Tokue A, Saito S, Kawauchi C, Mizutani A. Comparison of the effects of vasopressin and norepinephrine on organ perfusion during septic shock in streptozotocin-induced diabetic rats. J Anesth. 2010;24(4):553-63.

Hoffman BB. Catecolaminas, fármacos simpatomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In Goodman& Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica 10^aed. Trad. CM Vorsatz, CH Cosendey, DC Rodrigues, MA Valejo, PL Voeux. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2005. p. 89-117.

Hong E, Huang F, Villafañá S. Effect of early diabetes on the response to norepinephrine and dopamine in pithed Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. ClinExpHypertens. 2010;32(6):390-4.

Inagawa, M, Ichinohe T, Kaneko Y. Felypressin, but not epinephrine, reduces myocardial oxygen tension after an injection of dental local anesthetic solution at routine doses. J Oral Maxillofac Surg. 2010;68:1013-17.

International Association for the Study of Pain (IASP, a). "Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Press, Seattle, 1994.[acesso em 2016 abr 16] disponível em: "<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain>".

International Association for the Study of Pain (IASP, b). "Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Press, Seattle, 1994.[acesso em 2016 abr 16] disponível em: "<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Nociception>".

Jackson EK. Vasopressin and other agents affecting the renal conservation of water. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006, p. 771-88.

JNC7. "The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure" (JNC 7). U. S. Department of Health and Human Services; National Institutes of Health; National Heart, Lung, and Blood Institute, National High Blood Pressure Education Program. 2004. [acesso em 2008 mai 5] disponível em: "www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/index.htm".

Katz S, Drum M, Reader A, Nusstein J, Beck M.A prospective, randomized, double-blind comparison of 2% lidocaine with 1:100,000 epinephrine, 4% prilocaine with 1:200,000 epinephrine, and 4% prilocaine for maxillary infiltrations. *AnesthProg*. 2010; 57(2):45-51.

Kawano Y, Matsuoka H, Nishikimi T, Takishita S, Omae T. The role of vasopressin in essential hypertension: Plasma levels and effects of the V₁ receptor antagonist OPC-21268 during different dietary sodium intakes. *Am. J. Hypertens.*, 1997, 10:1240-4.

Knoll-Köhler E, Förtsch G. Pulpal anesthesia dependent on epinephrine dose in 2% lidocaine. A randomized controlled double-blind crossover study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992 May;73(5):537-40.

Leenen FHH, Myers MG. Pressor mechanisms in renovascular hypertensive rats, In de Jong W (ed): *Handbook of Hypertension, Volume 4, Experimental and Genetic Models of Hypertension*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1984, p. 24-53.

Leung JY, Kwok EW, Liu GY, Pang CC. Attenuated alpha-adrenoceptor-mediated arterial and venous constrictions in rat models of diabetes. *Eur J Pharmacol*. 2010;642(1-3):128-33.

Lima Leite A, Gualium Vaz Madureira Lobo J, Barbosa da Silva Pereira HA, Silva Fernandes M, Martini T, Zucki F, et al. Proteomic analysis of gastrocnemius muscle in rats with streptozotocin-induced diabetes and chronically exposed to fluoride. *PLoS One*. 2014;9(9):e106646.

Little JW. The impact on dentistry of recent advances in the management of Hypertension. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:591-9

Maxwell GM. The cardiovascular effects of octapressin. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1965; 158: 17-23.

Meechan JG, Welbury RR. Metabolic Responses to Oral Surgery Under Local Anesthesia and Sedation with Intravenous Midazolam: The Effects of Two Different Local Anesthetics. *AnesthProg*. 1992; 39:9-12

Meechan JG, Thomason JM, Rattray DTR, Parry G. The use of dental local anesthesia in cardiac transplant patients. *J Dent Res* 1997;76: 1125-54.

Meechan JG, Robb ND, Seymour RA. Pain and anxiety control for the conscious dental patient. Oxford: University Press, 1998. p. 29-42.

Nagpal R, Yamashiro Y, Izumi Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:793898.

Nakazawa T, Sato A, Mori A, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, et al. Beta-adrenoceptor-mediated vasodilation of retinal blood vessels is reduced in streptozotocin-induced diabetic rats. *VasculPharmacol*. 2008;49(2-3):77-83.

Niwa H, Sato Y, Matsuura H. Safety of dental treatment in patients with previously diagnosed acute myocardial infarction or unstable angina pectoris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:35-41.

Oliveira NS, Gazola R, Singi G. Effects of vasoconstrictors used in local anesthesia upon isolated rat heart. *Pharmacol Res*. 2002;46(1):15-8.

Oliveira GM, Fleury CA, Santos CF, Faria FAC. Avaliação dos efeitos da infiltração de adrenalina e felipressina em incisivos superiores de ratos sobre a pressão arterial. In: Encontro Nacional de Biomedicina, 18, 2015, Botucatu. Anais: Botucatu: ENBM, 2015, 63 p.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ(a). Anestésicos locais. In Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia* 5ªed. Trad. Voeux PL, Moreira AJMS. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 696-702.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ(b). Transmissão noradrenérgica. In Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Farmacologia* 5ªed. Trad. Voeux PL, Moreira AJMS. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, p. 182-224.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown JD. Heart Disease and Stroke Statistics--2011 Update : A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2011; Feb 1;123(4):e18-e209.

Romero-Nava R, Rodriguez JE, Reséndiz-Albor AA, Sánchez-Muñoz F, Ruiz-Hernández A, Huang F, Hong E, Villafañá S. Changes in protein and gene expression of angiotensin II receptors (AT1 and AT2) in aorta of diabetic and hypertensive rats. *ClinExpHypertens*. 2016;38(1):56-62. doi: 10.3109/10641963.2015.1060984. Epub 2015 Aug 13.

Rumble JR, Cooper ME, Soulis T, Cox A, Wu L, Youssef S, et al. Vascular hypertrophy in experimental diabetes: Role of advanced glycation end products. *J Clin Invest*. 1997; 99(5):1016-27.

Salonen M, Ferssell H, Scheinin M. Local dental anaesthesia with lidocaine and adrenaline. Effects on plasma catecholamines, heart rate and blood pressure. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1988; 17(6):392-4.

Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One*. 2015;10:e0134601.

Singh P, Lee JS. Cardiovascular and Central Nervous System Toxicity of Local Anesthetics. In *Seminars in Anesthesia, Perioperative Medicine and Pain*. 1998;17(1): 18-23.

Sivitz WI, Wayson SM, Bayless ML, Sinkey CA, Haynes WG. Obesity impairs vascular relaxation in human subjects: hyperglycemia exaggerates adrenergic vasoconstriction arterial dysfunction in obesity and diabetes. *J Diabetes Complications*. 2007; 21(3):149-57.

Southerland JH, Taylor GW, Offenbacher S. Diabetes and periodontal infection: making the connection. *Clin Diabetes* 2005; 23(4):171-8.

Sowers JR, Haffner S. Treatment of cardiovascular and renal risk factors in the diabetic hypertensive. *Hypertension* 2002; 40:781-8.

Struthers AD, Reid JL, Whitesmith R, Rodger JL. Effect of intravenous adrenaline on electrocardiogram, blood pressure and serum potassium. *Br Heart J*. 1983;49:90-3.

Struthers AD, Brown DC, Brown MJ, Schumer B, Bloom SR. Selective alpha 2 receptor blockade facilitates the insulin response to adrenaline but not to glucose in man. *ClinEndocrinol*. 1985; 23(5):539-46.

Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology* 2007; 12 (3):261-6.

Tily FE, Thomas S. Glycemic effect of administration of epinephrine-containing local anaesthesia in patients undergoing dental extraction, a comparison between healthy and diabetic patients. *Int Dent J* 2007; 57(2):77-83.

Turner NC, White P. Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinaemic obese Zucker rats. *J CardiovascPharmacol.* 1996; 27(6):884-90.

Utimura R, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DMAC, Noronha IL, Zatz R. Mycophenolatemofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes. *Kidney Int.* 2003; 63:209-16.

Van Gurp PJ, Willemsen JJ, Lenders JW, Ross HA, Sweep CG, Smits P, et al. Forearm vasoconstrictor response in uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Eur J Invest.* 2006; 36(10):674-81.

VanhouttePM..Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J.* 2009 Apr;73(4):595-601.

Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL. Some statistical methods in circulation research. *Circ. Res.* 1980; 47:1-9

Westfall TC, Westfall DP. Adrenergic agonists and antagonists. In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. New York: McGraw-Hill; 2006, p. 237-95.

Wolkow PP, Bujak-Giżycka B, Jawień J, Olszanecki R, Madej J, Rutowski J, Korbut R. Exogenous Angiotensin I Metabolism in Aorta Isolated from Streptozotocin Treated Diabetic Rats. *J Diabetes Res.* 2016;2016:4846819. Epub 2016 Oct 10.

Xylestesin . Injetável: uso adulto e pediátrico [Bula de remédio]. Responsável Técnico Dr. José Carlos Módolo - CRF-SP nº 10.446. Itapira-SP: CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.; 2016.

Yanagidate F, Strichartz GR. Local anesthetics. *HandbExpPharmacol.* 2007;(177):95-127.