STEPHEN FERNANDES DE PAULA RODRIGUES

**INTERAÇÃO ANLODIPINA/DICLOFENACO SOBRE O COMPORTAMENTO
LEUCOCITÁRIO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) E
RATOS WISTAR NORMOTENSOS**

São Paulo

2008

STEPHEN FERNANDES DE PAULA RODRIGUES

**INTERAÇÃO ANLODIPINA/DICLOFENACO SOBRE O COMPORTAMENTO
LEUCOCITÁRIO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) E
RATOS WISTAR NORMOTENSOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Farmacologia).

São Paulo

2008

STEPHEN FERNANDES DE PAULA RODRIGUES

**INTERAÇÃO ANLODIPINA/DICLOFENACO SOBRE O COMPORTAMENTO
LEUCOCITÁRIO EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) E
RATOS WISTAR NORMOTENSOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes

São Paulo

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Stephen Fernandes de Paula Rodrigues.

Título da Tese: Interação anlodipina/diclofenaco sobre o comportamento leucocitário em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos Wistar normotensos.

Orientador(a): Zuleica Bruno Fortes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **007** nas fls. **3** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes, Coordenadora da Linha de Pesquisa: **"Reatividade microcirculatória em patologias experimentais-Papel do endotélio"** do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Eliana Hiromi Akamine, Juliano Luiz Sartoretto, Maristella de Almeida V.Landgraf, Stephen Fernandes de P. Rodrigues, Viviani Milan F.Rastelli e Luiz Lopes Martinez**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **20.04.2004**.

São Paulo, 26 de abril de 2004

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

DEDICATÓRIA

A **Lidiana Duarte de Almeida Paula**,
minha esposa, que soube como ninguém
juntar elementos como: apoio,
companheirismo, incentivo e amor, que
alicerçaram a construção desse trabalho;

A **Júlia Duarte de Paula**, minha filha,
fonte de alívio em dias difíceis e oásis
transmissor de força de vontade quando
em meio a um deserto de negativismo;

A **José Paula Rodrigues e Eumi Pereira
Fernandes de Paula**, meus pais, pelo
apoio, carinho e incentivo constantes;
porto seguro, com quem posso contar em
todos os momentos;

A **Michely, Kelly e José**, meus irmãos,
pelo carinho e incentivo transmitidos a
mim durante todo o doutoramento;

A **Valdemiro e Mirtes**, meus sogro e
sogra, pela ajuda nos momentos difíceis.

OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes, minha mestre e orientadora, pela importante participação na minha vida acadêmica, marcada por ensinamentos que não só foram valiosos para o adequado andamento e conclusão desse trabalho como, acredito, serão muito valiosos daqui para frente;

À Dra. Dorothy Nigro, Dra. Maria Helena de Carvalho e Dra. Rita Tostes, docentes do Departamento de Farmacologia da USP, pelos ensinamentos e discussões científicas que muito contribuíram na minha formação;

Ao Dr. Geert Schmid-Schonbein e Dr. Edward Tran, docente e pós-doc, respectivamente, da Universidade da Califórnia em San Diego, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante parte do meu doutorado;

Ao Dr. Joilson, Dr. Juliano, Dr. Márcio e Ms. Rodrigo, amigos do laboratório, pelas agradáveis e importantes discussões “intra ou extra laboratoriais” que direta ou indiretamente contribuíram com esse trabalho;

Ao Dr. Augusto, Dra. Daniela, Dra. Eliana, Dr. José Walber, Dra. Liliam, Dr. Luís, Dra. Maria do Carmo, Dra. Maristella, Dra. Michele, Dra. Rossana, Dra. Viviani, Ms. André, Ms. Fernanda Giachini, Ms. Fernando Carneiro, Ms. Graziela, Ms. João, Ms. Lílian, Álvaro, Ana Lúcia, Andréia, Beatriz, Fernando Filgueira, Núbia, Renata, Simone e Viviana, amigos do laboratório, pela colaboração, ensinamentos, e agradável convívio;

A Dra. Maria Aparecida, Dra. Rosangela, Antonio e Tyieko, técnicos do Laboratório de Hipertensão, que muito contribuíram para a adequada conclusão do presente trabalho;

A Alice, Irene, Manoel, Manoel Santos, Marta, Rita e Sonia, funcionários do Departamento de Farmacologia, que deram o suporte necessário para a realização desse trabalho;

A Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, por colocar a disposição o laboratório.

OBRIGADO!

“Não entendo. Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender. Entender é sempre limitado. Mas não entender pode não ter fronteiras. Sinto que sou muito mais completa quando não entendo. Não entender, do modo como falo, é um dom. Não entender, mas não como um simples de espírito. O bom é ser inteligente e não entender. É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida. É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice. Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco. Não demais: mas pelo menos entender que não entendo”.

Clarice Lispector

RESUMO

RODRIGUES, S. F. **Interação anlodipina/diclofenaco sobre o comportamento leucocitário em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos Wistar normotensos.** 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Anlodipina, fármaco anti-hipertensivo, e diclofenaco, fármaco antiinflamatório, podem ocasionalmente ser combinados principalmente em idosos. Investigamos se anlodipina interfere com o efeito antimigratório do diclofenaco tanto na hipertensão como na normotensão. Para isto, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos Wistar foram tratados com diclofenaco (1 mg/kg/dia, 15 dias) ou anlodipina (10 mg/kg/dia, 15 dias) administrados isoladamente ou combinados ou ainda com hidralazina nas doses de ~ 3,5 mg/kg/dia e ~ 14 mg/kg/dia e anlodipina 3 mg/kg/dia, durante 15 dias, para verificar o efeito da redução da pressão arterial (PA) sobre a migração leucocitária. Rolamento, aderência e migração leucocitárias foram estudados por microscopia intravital. A PA de SHR ($183,1 \pm 4,4$) não foi alterada após administração de diclofenaco ($180,0 \pm 2,3$), anlodipina 3 mg/kg ($172,1 \pm 8,7$) e hidralazina ~ 3,5 mg/kg ($192,2 \pm 2,3$) e foi reduzida após tratamento com hidralazina ~ 14 mg/kg ($153,2 \pm 4,6$) ou anlodipina 10 mg/kg combinada ($163,4 \pm 5,1$) ou não ($156,3 \pm 4,3$) com diclofenaco. Nenhum tratamento exceto hidralazina ~ 14 mg/kg ($112,8 \pm 2,6$) reduziu a PA de ratos Wistar ($123,3 \pm 2,4$). O tratamento de SHR com diclofenaco ou anlodipina 10 mg/kg reduziu aderência e migração leucocitárias e a expressão da molécula de aderência intercelular-1 (ICAM-1). Somente o tratamento com diclofenaco reduziu rolamento leucocitário. O efeito do diclofenaco sobre a aderência e migração leucocitárias foi reduzido após combinação com anlodipina 10 mg/kg em SHR. O anti-hipertensivo prejudicou a redução da expressão de ICAM-1 causada pelo antiinflamatório. Em ratos Wistar tanto diclofenaco quanto anlodipina 10 mg/kg reduziram migração leucocitária, somente o diclofenaco reduziu aderência. Nenhum tratamento reduziu o rolamento de leucócitos. As expressões de ICAM-1 e da molécula de aderência celular endotelial-plaquetária-1 (PECAM-1) foram reduzidas pela anlodipina 10 mg/kg em ratos Wistar. Esse tratamento reduziu o efeito do diclofenaco sobre a aderência e migração leucocitárias em ratos Wistar. Hidralazina ~ 14 mg/kg reduziu aderência e migração leucocitárias em SHR por reduzir a expressão de ICAM-1. Em ratos Wistar hidralazina ~ 14 mg/kg reduziu

migração leucocitária possivelmente por reduzir a expressão de P-selectina. Anlodipina em dose que não reduz a PA de SHR não reduz aderência e migração leucocitárias. Ao contrário, hidralazina em dose que não reduz a PA diminui aderência e migração leucocitárias em SHR, mas não em ratos Wistar. Nenhum tratamento aumentou a taxa de atrito venular ou modificou o diâmetro venular, número de leucócitos circulantes ou expressão de CD18. As concentrações plasmáticas de diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg administradas isoladamente ou combinadas foram semelhantes. Concluimos que anlodipina reduz migração leucocitária em SHR e ratos Wistar por reduzir a expressão de ICAM-1 em células endoteliais venulares. A redução da migração leucocitária em ratos Wistar pode decorrer da redução da expressão de PECAM-1 em células endoteliais. A redução da PA causada pela anlodipina em SHR parece contribuir para a redução da migração leucocitária. Hidralazina reduz migração leucocitária em SHR independentemente de seu efeito reduzindo a PA. Anlodipina reduz o efeito do diclofenaco sobre a migração leucocitária em SHR por interferir na redução de ICAM-1. Não foi observada interação farmacocinética ou sobre as outras moléculas de aderência testadas.

Palavras-chave: SHR. Ratos Wistar. Anlodipina. Diclofenaco. Interação leucócito-endotélio. ICAM-1.

ABSTRACT

RODRIGUES, S. F. **Amlodipine and diclofenac interaction on leukocyte behavior in spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar rats.** 2008. 182 p. Doctoral thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Amlodipine, an antihypertensive drug, and diclofenac, an antiinflammatory drug, may generally be combined mainly in the elderly. We aim thus to determine if amlodipine interferes with the antimigratory effect of diclofenac either in hypertension or normotension condition. For this, male spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar rats were treated with either diclofenac (1 mg/kg/day, 15days) or amlodipine (10 mg/kg/day, 15days) alone or combined. To verify the effect of the blood pressure (BP) reduction on the leukocyte migration SHR and control Wistar rats were treated with hydralazine at ~ 3.5 mg/kg/day and ~ 14 mg/kg/day (for 15days) and amlodipine 3 mg/kg/day (for 15days). Leukocyte rolling, adherence and migration were studied by intravital microscopy. Diclofenac (180.0 ± 2.3), amlodipine 3 mg/kg (172.1 ± 8.7) and hydralazine ~ 3.5 mg/kg (192.2 ± 2.3) did not change. Hydralazine ~ 14 mg/kg (153.2 ± 4.6) and amlodipine 10 mg/kg combined (163.4 ± 5.1) or not (156.3 ± 4.3) with diclofenac reduced the BP (mmHg) levels in SHR (183.1 ± 4.4). No treatment except hydralazine ~ 14 mg/kg (112.8 ± 2.6) reduced the BP levels in Wistar rats (123.3 ± 2.4). In SHR, diclofenac and amlodipine 10 mg/kg reduced leukocyte adherence, migration and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression whereas only diclofenac reduced rolling leukocytes as well. Combined with amlodipine 10 mg/kg the diclofenac effect on the leukocyte adherence and migration was reduced in SHR possibly by impairing the reduction of the ICAM-1 expression. In Wistar rats diclofenac and amlodipine 10 mg/kg reduced leukocyte migration, only diclofenac reduced adherence. No treatment reduced rolling leukocytes. Reduction of ICAM-1 and platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expressions were observed in amlodipine (10 mg/kg) treated-Wistar rats. This treatment abrogated the diclofenac effect on the leukocyte adherence and migration in Wistar rats. Similar to amlodipine 10 mg/kg hydralazine ~ 14 mg/kg reduced leukocyte adherence and migration in SHR by reducing ICAM-1 expression. In Wistar rats hydralazine ~ 14 mg/kg reduced leukocyte migration possibly by reducing P-selectin expression. Amlodipine at a dose that did not reduce the BP levels in SHR was not able to

reduce leukocyte adherence and migration. On the contrary, low dose of hydralazine reduced leukocyte adherence and migration in SHR but not in Wistar rats. Neither treatment tested increased the venular shear rate or modified the venular diameters, number of circulating leukocytes or CD18 expression. No difference could be found in plasma concentrations of diclofenac and amlodipine 10 mg/kg given alone or in association. In conclusion, amlodipine reduces leukocyte migration in both SHR and Wistar rats by reducing venular endothelial cell ICAM-1 expression. Reduction on the endothelial PECAM-1 expression also contributes to the antimigratory effect of amlodipine in Wistar rats. Reduction of the BP levels seems to contribute to reduction of the leukocyte migration caused by amlodipine in SHR. On the contrary, reduction of the leukocyte migration caused by hydralazine in SHR was not dependent on the BP reduction. Amlodipine reduces the effect of diclofenac on the leukocyte migration by impairing the reduction of the ICAM-1 expression in SHR. A pharmacokinetic interaction as well as an effect on the other adhesion molecules tested could be discarded.

Key words: SHR. Wistar rats. Amlodipine. Diclofenac. Leukocyte-endothelial interaction. ICAM-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo representativo do comportamento leucocitário após estímulo inflamatório tecidual local.....	31
Figura 2: Representação do sistema de microscopia intravital.....	43
Figura 3: Pressão arterial caudal de SHR tratados com anlodipina 3 mg/kg ou anlodipina 10 mg/kg.....	56
Figura 4: Pressão arterial caudal de SHR tratados com hidralazina ~ 3,5 mg/kg ou hidralazina ~ 14 mg/kg.....	57
Figura 5: Pressão arterial caudal de SHR em diferentes grupos experimentais.....	57
Figura 6: Pressão arterial caudal de ratos Wistar tratados com hidralazina ~ 3,5 mg/kg ou hidralazina ~ 14 mg/kg.....	58
Figura 7: Pressão arterial caudal de ratos Wistar em diferentes grupos experimentais.....	58
Figura 8: Rolamento leucocitário em SHR nos diversos grupos experimentais.....	60
Figura 9: Rolamento leucocitário em ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	60
Figura 10: Velocidade do rolamento leucocitário em SHR nos diversos grupos experimentais.....	61
Figura 11: Velocidade do rolamento leucocitário em ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	62
Figura 12: Aderência leucocitária em SHR nos diversos grupos experimentais.....	63
Figura 13: Aderência leucocitária em ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	64
Figura 14: Migração leucocitária em SHR nos diversos grupos experimentais.....	66

Figura 15: Migração leucocitária em ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	67
Figura 16: Curvas de concentração plasmática e área sob a curva (AUC) de diclofenaco, associado ou não a anlodipina 10 mg/kg, em SHR.....	72
Figura 17: Curvas de concentração plasmática e área sob a curva (AUC) de anlodipina 10 mg/kg, associada ou não ao diclofenaco, em SHR.....	72
Figura 18: Curvas de concentração plasmática e área sob a curva (AUC) de diclofenaco, associado ou não a anlodipina 10 mg/kg, em ratos Wistar.....	73
Figura 19: Curvas de concentração plasmática e área sob a curva (AUC) de anlodipina 10 mg/kg, associada ou não ao diclofenaco, em ratos Wistar.....	73
Figura 20: Expressão protéica de ICAM-1 em vênulas de SHR nos diversos grupos experimentais.....	75
Figura 21: Expressão protéica de PECAM-1 em vênulas de SHR nos diversos grupos experimentais.....	76
Figura 22: Expressão protéica de P-selectina em vênulas de SHR nos diversos grupos experimentais.....	77
Figura 23: Expressão protéica de ICAM-1 em vênulas de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	78
Figura 24: Expressão protéica de PECAM-1 em vênulas de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	79
Figura 25: Expressão protéica de P-selectina em vênulas de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	80
Figura 26: Expressão gênica de ICAM-1 na fáscia espermática de SHR nos diversos grupos experimentais.....	81
Figura 27: Expressão gênica de PECAM-1 na fáscia espermática de SHR nos diversos grupos experimentais.....	82

Figura 28: Expressão gênica de P-selectina na fáscia espermática de SHR nos diversos grupos experimentais.....	82
Figura 29: Expressão gênica de ICAM-1 na fáscia espermática de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	83
Figura 30: Expressão gênica de PECAM-1 na fáscia espermática de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	83
Figura 31: Expressão gênica de P-selectina na fáscia espermática de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	84
Figura 32: Expressão protéica de CD18 em granulócitos de SHR nos diversos grupos experimentais.....	85
Figura 33: Expressão protéica de CD18 em granulócitos de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	86
Figura 34: Expressão protéica de L-selectina em granulócitos de SHR nos diversos grupos experimentais.....	87
Figura 35: Expressão protéica de L-selectina em granulócitos de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	88
Quadro 1: Efeito dos tratamentos com veículo, diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg ou com a associação sobre a expressão protéica das moléculas de aderência celular (CAMs) estudadas em SHR e ratos Wistar.....	89
Quadro 2: Efeito dos tratamentos com veículo ou hidralazina ~ 14 mg/kg sobre a expressão protéica das moléculas de aderência celular (CAMs) estudadas em SHR e ratos Wistar.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas moléculas importantes para o processo de extravasamento vascular de leucócitos.....	30
Tabela 2: Massa corpórea absoluta e ganho de massa corpórea de SHR machos nos diversos grupos experimentais.....	53
Tabela 3: Massa corpórea absoluta e ganho de massa corpórea de ratos Wistar nos diversos grupos experimentais.....	54
Tabela 4: Consumos hídrico e de ração e determinação do volume urinário de SHR e ratos Wistar tratados ou não com hidralazina.....	55
Tabela 5: Velocidade do fluxo sanguíneo e taxa de atrito venular de SHR e ratos Wistar tratados com veículo, diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg ou com a associação.....	68
Tabela 6: Velocidade do fluxo sanguíneo e taxa de atrito venular de SHR e ratos Wistar tratados com veículo ou hidralazina ~ 14 mg/kg.....	69
Tabela 7: Número de leucócitos total e diferencial de SHR e ratos Wistar tratados com veículo, diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg ou com a associação.....	70
Tabela 8: Número de leucócitos total e diferencial de SHR e ratos Wistar tratados com veículo ou hidralazina ~ 14 mg/kg.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina

ACh – acetilcolina

ADH – hormônio antidiurético

AINEs – antiinflamatórios não-esteróides

Ang II – angiotensina II

AP-1 – proteína-1 ativadora

ApoEKO – nocaute para apolipoproteína E

AUC – área sob a curva

BSA – albumina sérica bovina

BP – “blood pressure”

CAMs – moléculas de aderência celular

CCL5 – CC-quimiocina ligante-5

COX – ciclooxigenase

CXCL4 – CXC-quimiocina ligante-4

DAB – diaminobenzidina

DOCA-sal – desoxicorticosterona acetato-sal

EDRF – fator relaxante derivado do endotélio

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

ESL-1 – ligante 1 da E-selectina

GM-CSF – fator estimulador de colônia macrófago-granulócito

HA – hipertensão arterial

HUVECs – células endoteliais de veia umbilical humana

ICAM-1 – molécula de aderência intercelular-1

ICAM-2 – molécula de aderência intercelular-2

ICAM-3 – molécula de aderência intercelular-3

I κ B – inibidor kappaB

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LFA-1 – antígeno-1 associado à função linfocitária

L-NAME – N^G-nitro-L-arginina metil ester

LT- α – linfotoxina alfa

LT- β – linfotoxina beta
L-NMMA – N^G-monometil L-arginina
Mac-1 – receptor 1 de macrófago
MCP-1 – proteína quimiotática para monócitos-1
MIP-1 α – proteína-1 α inflamatória de macrófago
NA – noradrenalina
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-IL-6 – fator nuclear de IL-6
NF κ B – fator nuclear κ B
NO – óxido nítrico
NPS – nitroprussiato de sódio
PA – pressão arterial
PAF – fator ativador plaquetário
PBS – tampão fosfato-salina
PCR – reação de polimerase em cadeia
PECAM-1 – molécula de aderência celular endotelial-plaquetária-1
PGE₂ – prostaglandina E₂
PGH₁ – prostaglandina H₁
PGH₂ – prostaglandina H₂
PGI₂ – prostaglandina I₂
PGs – protaglandinas
PSGL-1 – glicoproteína ligante 1 da P-selectina
RANTES – “regulated on activation normally T-cell expressed and secreted”
RIP – proteína de interação com o receptor
RT – transcriptase reversa
SHR – ratos espontaneamente hipertensos
SHRSP – ratos espontaneamente hipertensos “stroke prone”
TACE – enzima conversora de fator de necrose tumoral alfa
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
TNF- β – fator de necrose tumoral beta
TNFR1 – receptor 1 de fator de necrose tumoral alfa
TNFR2 – receptor 2 de fator de necrose tumoral alfa
TRADD – “death-domain” associada ao receptor de fator de necrose tumoral

TRAF2 – fator 2 associado ao receptor de fator de necrose tumoral

TX – tromboxano

TXA₂ – tromboxano A₂

VCAM-1 – molécula de aderência de endotélio vascular-1

VLA-4 – antígeno 4 muito lento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Hipertensão Arterial	24
1.2 Inflamação	27
1.3 Inflamação e Hipertensão Arterial	32
1.4 Bloqueadores de Canais de Cálcio	33
1.5 Antiinflamatórios Não-Esteróides (AINEs)	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Animais	39
2.2 Grupos Experimentais e Tratamentos	39
2.3 Determinação dos Consumos Hídrico e de Ração e do Volume Urinário	41
2.4 Avaliação da Pressão Arterial Indireta e Massa Corpórea	41
2.5 Microscopia Intravital na Microcirculação	42
2.5.1 Comportamento Leucocitário	43
2.5.2 Velocidade do Fluxo Sangüíneo e Taxa de Atrito Venular ("Shear Rate")	44
2.6 Leucogramas Total e Diferencial	45
2.7 Determinação das Concentrações Plasmáticas de Diclofenaco e Anlodipina	45
2.8 Preparação do Tecido e Reação de Imunohistoquímica	47
2.9 Obtenção do RNAm, Reação de RT e PCR em Tempo Real	48
2.10 Citometria de Fluxo	49
2.11 Análise Estatística	50
3 RESULTADOS	52
3.1 Massa Corpórea	52
3.2 Consumos Hídrico e de Ração e Determinação do Volume Urinário	54
3.3 Pressão Arterial Caudal	55
3.4 Diâmetro Venular	59
3.5 Rolamento Leucocitário	59
3.6 Velocidade do Rolamento Leucocitário	61
3.7 Aderência Leucocitária	62
3.8 Migração Leucocitária	64

3.9 Velocidade do Fluxo Sanguíneo e Taxa de Atrito Venular ("Shear Rate").....	67
3.10 Leucogramas Total e Diferencial.....	69
3.11 Concentrações Plasmáticas de Diclofenaco e Anlodipina.....	71
3.12 Imunohistoquímica para Determinação da Concentração Protéica de ICAM-1, PECAM-1 e P-selectina.....	73
3.13 RT-PCR para Determinação da Expressão Gênica de ICAM-1, PECAM-1 e P-selectina.....	81
3.14 Citometria de Fluxo para Determinação da Concentração Protéica de CD18 e L-selectina.....	84
4 DISCUSSÃO	92
5 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXOS	124
ANEXO A – Manuscrito aceito para publicação: "Amlodipine reduces the antimigratory effect of diclofenac in spontaneously hypertensiveb rats".....	125
ANEXO B – Manuscrito submetido à publicação: "Hydralazine reduces leukocyte migration by different mechanisms in spontaneously hypertensive and in normotensive rats".....	140

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial (HA) é uma doença de origem multifatorial caracterizada por pressão sistólica igual ou superior a 140 mmHg e pressão diastólica igual ou superior a 90 mmHg. A HA acarreta elevado custo médico-social principalmente por participar da gênese ou desenvolvimento de doenças cerebrovascular e coronária, da insuficiência cardíaca e da insuficiência renal crônica, sendo a principal causa de morte e incapacidade entre adultos (PICKERING, 1995).

Vários mecanismos controlam a pressão arterial (PA), sendo sua regulação aguda feita pelos pressorreceptores, receptores cardiopulmonares e quimiorreceptores, os quais ativam vias neuro-humorais de controle que modulam a atividade do sistema nervoso simpático. O controle em longo prazo da PA é realizado pelos rins e líquidos corporais (GUYTON et al., 1972).

Na fase crônica da HA observa-se aumento da resistência periférica com débito cardíaco normal. O controle da resistência periférica total é um fator importante na regulação da PA. A resistência periférica é controlada principalmente pelo tônus vascular e depende da viscosidade do sangue, velocidade do fluxo, comprimento do vaso e da relação parede/luz, sendo gerada por arteríolas de calibre inferior a 500 μm . O calibre desses vasos é controlado por hormônios ou autacóides específicos, e esta atividade representa o tônus basal. O tônus basal pode ser modulado pelo sistema nervoso simpático, catecolaminas circulantes, metabólitos locais (O_2 , CO_2), hiperosmolaridade e agentes vasoativos (KRIEGER e MICHELINI, 1992). Alguns desses agentes atuam de maneira endócrina e neuroendócrina como a angiotensina II (Ang II), a vasopressina e as catecolaminas circulantes.

Na HA são observadas modificações funcionais e estruturais nos vasos sangüíneos. Segundo alguns autores as modificações estruturais seriam responsáveis pelo aumento do tônus basal (FOLKOW, 1990). As principais modificações estruturais ocorridas durante a HA são hipertrofia da camada média muscular e hiperplasia, que causam espessamento da parede vascular com redução

do raio interno e remodelamento dos elementos teciduais presentes no vaso, que também reduz a relação parede/luz (HEAGERTY et al., 1993; MULVANY, 1993). Na hipertensão secundária, a hipertrofia é uma adaptação à alta carga pressórica, porém na hipertensão primária há indícios de que o desenvolvimento das modificações estruturais acompanha o desenvolvimento da hipertensão (KORNER et al., 1989). Somente as modificações estruturais não explicam a diferença na resposta aos agentes vasopressores nos modelos de hipertensão experimental. Vasos sangüíneos de animais hipertensos apresentam maior reatividade aos agentes pressores que vasos de animais normotensos, o que depende do modelo estudado e do agente pressor utilizado (BOHR, 1974; BOHR e WEBB, 1984). Este aumento de reatividade é associado à maior sensibilidade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstritores, sendo que em estados crônicos de HA as modificações estruturais intensificam a reatividade (BERECEK et al., 1980; LONGHURST et al., 1988). Além disso, a disfunção do endotélio vascular, observada em doenças como HA, aterosclerose e hiperlipidemia, pode contribuir para o aumento da responsividade a agentes vasoconstritores, bem como para a redução da resposta a agentes vasodilatadores.

O endotélio tem importante papel na homeostase vascular, participando da modulação da resposta inflamatória, regulando o tônus vasomotor, o crescimento e proliferação vasculares e modulando a coagulação sangüínea. Rees et al. (1989) demonstraram que a infusão do inibidor da síntese de óxido nítrico (NO), N^G-monometil L-arginina (L-NMMA), na artéria carótida direita de coelhos, causa aumento da PA média de modo dose-dependente, inibição da ação hipotensora da acetilcolina (ACh) e bloqueio da liberação de NO induzida pela ACh, o que levou à proposta da participação do fator relaxante derivado do endotélio-NO (EDRF-NO) na regulação da PA. Experimentos realizados em vários leitos vasculares demonstraram que a infusão de L-NMMA induz aumento da PA de forma dose-dependente e vasoconstrição regional, efeitos estes revertidos pela administração de L-arginina (GARDINER et al., 1990).

Em modelos de hipertensão induzida experimentalmente como a desoxicorticosterona acetato-sal (DOCA-sal), renovascular e coartação da aorta, a resposta vasodilatadora dependente do endotélio testada com o uso de ACh e ionóforo de cálcio A23187 está diminuída, mas é corrigida após normalização da PA.

Ao contrário, a resposta vasodilatadora independente do endotélio testada com o uso de nitroprussiato de sódio (NPS), não está alterada, demonstrando que a responsividade do músculo liso a agentes vasodilatadores está normal (LOCKETTE et al., 1986; CARVALHO et al., 1987).

Semelhante ao observado em modelos de hipertensão induzida, na hipertensão espontânea foi observado prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta (CARVALHO et al., 1987) e em artéria femoral de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (KONISHI e SU, 1983), em artéria mesentérica de SHR (CARVALHO et al., 1987; WATT e THURSTON, 1989) e de SHR “stroke prone” (SHRSP) (TESFAMARIAM e HALPERN, 1988) e em anéis de aorta de ratos hipertensos genéticos New Zealand (WINQUIST et al., 1984), quando comparados a ratos controle normotensos. Enquanto isso, a resposta vasodilatadora ao NPS nesses modelos de HA elevada manteve-se normal. Em anéis de aortas de ratos hipertensos Dahl-sal-sensíveis, há uma redução do relaxamento vascular dependente do endotélio e um aumento da responsividade à noradrenalina (NA) e serotonina (também conhecida como 5-HT, 5- hidroxitriptamina), sendo que nesses anéis a resposta ao NPS está normal (LUSCHER et al., 1987).

Em pacientes com HA essencial foi verificada redução na resposta vasodilatadora à ACh na artéria braquial em comparação aos pacientes normotensos, enquanto a resposta ao NPS não apresentou alterações (LINDER et al., 1990). Outro estudo realizado em pacientes com HA essencial, hipertensão por hiperaldosteronismo primário e hipertensão renovascular demonstrou que a vasodilatação à ACh na artéria braquial está consideravelmente reduzida nas três formas de HA, enquanto que a vasodilatação induzida pelo NPS é similar à de pacientes normotensos (TADDEI et al., 1993). A infusão de L-NMMA na artéria braquial de pacientes hipertensos elevou significativamente a resistência vascular basal comparada à do controle (PANZA et al., 1993). Esses estudos demonstram que, igualmente ao observado na hipertensão experimental, o paciente hipertenso também apresenta disfunção endotelial, constituindo-se num fator que amplifica a hipertensão e predispõe a doenças como aterosclerose.

Alguns estudos demonstram que certas alterações do endotélio que acarretam, por exemplo, a redução da vasodilatação à ACh tanto em SHR como em pacientes com HA essencial, podem ser decorrentes da maior disponibilidade de

prostaglandinas (PGs) vasoconstritoras, visto que essa menor vasodilatação foi revertida por inibidores da ciclooxygenase (COX) (TADDEI et al., 1993; WATT e THURSTON, 1989). Além disso, em artérias de SHR, a ACh em altas concentrações induz contração, a qual foi bloqueada por inibidores da COX (LUSCHER e VANHOUTTE, 1986; NIGRO et al., 1997), demonstrando ser causada por prostanóides vasoconstritores derivados do endotélio. O principal prostanóide envolvido nessa resposta é a prostaglandina H_2 (PGH_2), uma vez que pode ser inibida por antagonistas de receptores de PGH_2 e tromboxano A_2 (TXA_2), mas não por inibidores da tromboxano (TX) sintetase (KATO et al., 1990; GE et al., 1995; RAPOPORT e WILLIAMS, 1996). Outros autores observaram aumento da expressão de prostaglandina H_1 (PGH_1) sintase, e da liberação de PGH_2 (GE et al., 1995), demonstrando que o SHR apresenta maior produção desses prostanóides.

Estudos em que se mediu a produção de ânion superóxido têm demonstrado que o SHR apresenta maior produção desse radical livre em relação a ratos normotensos (BOULOUMIE et al., 1997; GRUNFELD et al., 1995). Sendo assim, o SHR além de possuir níveis mais elevados de prostanóides vasoconstritores, apresenta menor disponibilidade do NO, visto que sua reação com ânions superóxidos o inativa. Contudo, conforme o tipo de HA, o mecanismo envolvido na disfunção endotelial pode ser diferente, sendo que esta pode ser causada por diminuição da produção ou disponibilidade de vasodilatadores ou aumento da liberação de vasoconstritores.

1.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta tecidual à injúria que destrói, dilui ou inativa o agente agressor ou tecido lesionado. No processo inflamatório, sinais e sintomas clássicos presentes incluem: dor, calor, rubor, edema e perda de função. Microscopicamente, envolve uma intrincada série de eventos que inclui dilatação de arteríolas e vênulas, com conseqüente aumento do fluxo sangüíneo e permeabilidade, exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e migração leucocitária para o foco inflamatório (COLLINS, 2000; ZWEIFACH et al., 1965).

Células como mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos participam do processo, promovendo a liberação de mediadores que exercem inúmeras funções. Dentre os mediadores estão histamina, eicosanóides, citocinas, proteases, quimiocinas e agentes oxidantes (NATHAN, 2002). Durante o processo, células B e T, constituintes do sistema imunológico, também podem ser ativadas.

Pesquisas cujo enfoque é o mecanismo molecular das interações célula-célula nos vasos sanguíneos têm permitido a elucidação de uma série de questões relacionadas à (ao): comunicação célula endotelial-célula muscular lisa vascular; papel de células endoteliais atuando como barreira na prevenção da perda de fluido e proteínas para o interstício; ligação de células sanguíneas circulantes à parede dos vasos, dando início a importantes processos como trombogênese (plaquetas) e inflamação (leucócitos) (KRIEGLSTEIN e GRANGER, 2001).

Grande importância tem sido dada às moléculas de aderência celular (CAMs), pois além de sua participação em processos fisiológicos normais, atuam também como moduladores de interações celulares que contribuem para a disfunção vascular e lesão tecidual associada a diferentes doenças vasculares. Citocinas como o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) são capazes de induzir células endoteliais venulares a sintetizar e expressar as CAMs dentre as quais, E-selectina, molécula de aderência intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de aderência de endotélio vascular-1 (VCAM-1), possibilitando a interação das células endoteliais com leucócitos sanguíneos (COLLINS et al., 1995).

A expressão das CAMs mediada pelo $\text{TNF-}\alpha$ ocorre via ligação a receptores específicos denominados TNFR1 (p55) e TNFR2 (p75) (SLOWIK et al., 1993), o que acarreta ativação de proteínas adaptadoras intracelulares que se ligam a porções intracelulares dos receptores (LEDGERWOOD et al., 1999). Dentre essas proteínas estão: a “death-domain” associada ao receptor de TNF (TRADD), a proteína de interação com o receptor (RIP) e o fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF2), as quais têm sido associadas à ativação dos fatores de transcrição: nuclear κB ($\text{NF}\kappa\text{B}$) e proteína-1 ativadora (AP-1) (COLLINS et al., 1995). O $\text{TNF-}\alpha$ é membro de uma família composta por mais dois membros: fator de necrose tumoral beta ($\text{TNF-}\beta$) ou linfotoxina α ($\text{LT-}\alpha$) e a linfotoxina β ($\text{LT-}\beta$). O $\text{TNF-}\alpha$ humano é sintetizado como uma pró-proteína constituída de 233 aminoácidos, com massa molecular de 26 kDa, que é clivada por uma metaloprotease chamada enzima conversora de $\text{TNF-}\alpha$.

(TACE) em uma forma monomérica de 17 kDa, constituída de 157 aminoácidos não-glicosilados. Além de induzir a formação de CAMs pelo endotélio, o TNF- α também aumenta a produção de citocinas e promove a liberação de fatores de coagulação e ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelas células endoteliais. Além disso, estimula células B e T, induz febre, suprime a lipoproteína lipase nos adipócitos, estimula hepatócitos a produzir proteínas de fase aguda e ativa collagenases nos fibroblastos e osteoclastos nos ossos (EIGLER et al., 1997). A importância do TNF- α se torna mais visível em condições como artrite reumatóide e síndrome de Crohn onde elevadas concentrações dessa citocina têm sido observadas (EIGLER et al., 1997). A terapia anti-TNF tem se mostrado eficaz no tratamento de ambas as doenças (MAINI et al., 1999; HANAUER et al., 2002).

Com base nas suas características funcionais e bioquímicas, as CAMs têm sido classificadas em três famílias principais: selectinas, integrinas e moléculas com domínios semelhantes a imunoglobulinas (KRIEGLSTEIN e GRANGER, 2001).

As selectinas são CAMs expressas em leucócitos, células endoteliais e plaquetas, responsáveis pelo rolamento leucocitário na superfície de células endoteliais e agregação leucócito-plaqueta (Tabela 1). Citocinas, toxinas bacterianas e agentes oxidantes são capazes de promover a síntese de E- e P-selectinas em células endoteliais (GONZALEZ-AMARO e SANCHEZ-MADRID, 2001).

A família das integrinas inclui proteínas compostas de duas subunidades, α e β , ligadas não covalentemente, expressas, dentre outras células, em leucócitos, principalmente após estímulo com mediadores inflamatórios, sendo responsáveis pela aderência e migração através da parede endotelial e matriz extracelular (Tabela 1). Essas proteínas se ligam a moléculas de superfície celular, constituintes da superfamília das imunoglobulinas que incluem a ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e da molécula de aderência celular endotelial-plaquetária-1 (PECAM-1), e a proteínas da matriz extracelular como fibronectina, trombospondina, vitronectina e fibrinogênio e ao componente do complemento iC3b (KRIEGLSTEIN e GRANGER, 2001). As CAMs constituintes da superfamília das imunoglobulinas são expressas por células endoteliais e algumas delas também por leucócitos e plaquetas (Tabela 1). Assim como as integrinas, auxiliam nos processos de aderência e migração leucocitárias. Estímulos inflamatórios aumentam a expressão, por exemplo, de ICAM-1 e VCAM-1 (KRIEGLSTEIN e GRANGER, 2001).

Tabela 1 – Algumas moléculas importantes para o processo de extravasamento vascular de leucócitos.

Moléculas de aderência	Sinônimos	Principais ligantes	Função	Localização
<i>Selectinas</i>				
P-selectina	CD62P	PSGL-1, Lewis X	Rolamento	Endotélio, plaquetas
E-selectina	CD62E	ESL-1, Lewis X, PSGL-1	Rolamento	Endotélio
L-selectina	CD62L	Lewis X, CD34, PSGL-1	Rolamento	Leucócitos
<i>Integrinas</i>				
α L β 2 integrina	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1,-2,-3	Aderência	Leucócitos
α M β 2 integrina	Mac-1, CD11b/CD18	ICAM-1, iC3b	Aderência	Leucócitos
α 4 β 1 integrina	VLA-4, CD49d/CD29	VCAM-1	Aderência	Linfócitos, monócitos, eosinófilos
<i>Imunoglobulinas</i>				
ICAM-1	CD54	α L β 2, α M β 2	Aderência	Endotélio, linfócitos
ICAM-2	CD102	α L β 2, α M β 2	Aderência	Endotélio, linfócitos
VCAM-1	CD106	α 4 β 1	Aderência	Endotélio
PECAM-1	CD31	PECAM-1	Migração	Endotélio, leucócitos, plaquetas

ESL-1: ligante 1 da E-selectina; ICAM-1: molécula de aderência intercelular-1; ICAM-2: molécula de aderência intercelular-2; ICAM-3: molécula de aderência intercelular-3; LFA-1: antígeno-1 associado à função linfocitária; Mac-1: receptor 1 de macrófago; PECAM-1: molécula de aderência celular endotelial-plaquetária-1; PSGL-1: glicoproteína ligante 1 da P-selectina; VCAM-1: molécula de aderência de endotélio vascular-1; VLA-4: antígeno 4 muito lento.

Observações do comportamento leucocitário em vênulas realizadas *in vivo* permitiram a elaboração de um modelo de interação com as células endoteliais baseado em três passos sequenciais e coordenados, referentes ao recrutamento leucocitário: rolamento, aderência e migração (Figura 1). Para que ocorra a interação adesiva com as células endoteliais, os leucócitos circulantes devem se mover da porção central do fluxo sanguíneo em direção à parede dos vasos, estimulados por agentes quimiotáticos/inflamatórios. Como já foi dito, selectinas e seus ligantes

mediate as interações adesivas fracas que são manifestadas como rolamento leucocitário. Os leucócitos passam então a serem expostos a maiores concentrações de agentes quimiotáticos/inflamatórios, resultando em sua ativação e subsequente aderência dependente da combinação integrina-molécula da superfamília das imunoglobulinas, com simultânea redução da densidade de L-selectina (“shedding”). A migração trans-endotelial tem início com a locomoção de leucócitos aderidos em direção às junções célula endotelial-célula endotelial. Durante esse processo, a porção frontal da célula estabelece progressivamente novos contatos adesivos, enquanto reduzidas interações adesivas predominam na porção final. Esse processo ocorre tanto em grandes como em pequenos vasos, nesses últimos em maior extensão, principalmente em vênulas pós-capilares (KRIEGLSTEIN e GRANGER, 2001).

Figura 1: Modelo representativo do comportamento leucocitário após estímulo inflamatório tecidual local. São três os passos sequenciais constituintes do recrutamento leucocitário, que geralmente ocorrem de maneira coordenada: rolamento, aderência e migração. Moléculas de aderência das famílias das selectinas, integrinas e da superfamília das imunoglobulinas participam ativamente desse processo (COLLINS, 2000). ICAM-1: molécula de aderência intercelular-1; PECAM-1: molécula de aderência celular endotelial-plaquetária-1; PSGL-1: glicoproteína ligante 1 da P-selectina.

1.3 Inflamação e Hipertensão Arterial

Nos últimos anos, tem-se postulado a associação entre HA e a resposta inflamatória vascular mediante uma série de observações e estudos realizados. Parissis et al. (2000) demonstraram que pacientes com HA e/ou outros fatores de risco cardiovasculares maiores apresentavam além de disfunção endotelial, aumento da expressão de CAMs em células endoteliais. Pacientes com HA leve a moderada sem doença arterial coronariana possuíam níveis plasmáticos elevados de mediadores inflamatórios como quimiocinas do tipo CC, proteína-1 α inflamatória de macrófago (MIP-1 α) e RANTES (“regulated on activation normally T-cell expressed and secreted”), ICAM solúveis, VCAM e a citocina conhecida como fator estimulador de colônia macrófago-granulócito (GM-CSF) (PARISSIS et al., 2002).

Demonstrou-se que SHR e ratos hipertensos Dahl sal-sensíveis possuem elevado número de leucócitos circulantes quando comparados a ratos Wistar-Kyoto e Dahl sal-resistentes, respectivamente, os quais também estão mais ativados (SCHMID-SCHONBEIN et al., 1991; SHEN et al., 1995). Isso pode ser devido ao fato de que a aderência de leucócitos ao endotélio microvascular induzida por mediadores inflamatórios se encontra atenuada em SHR devido à menor aderência mediada por selectina. Tem-se assim número maior de leucócitos não marginalizados à parede vascular. Contrastando com a diminuição de selectinas, a expressão de ICAM-1 endotelial parece estar significativamente aumentada em SHR. Isto aumenta a possibilidade de aderência leucocitária em condições de menor tensão de cisalhamento microvascular, onde a marginação de leucócitos independe de selectinas (SUEMATSU et al., 2002). Além disso, sabe-se que neutrófilos ativados podem contribuir para a HA tanto por influenciar a resistência vascular capilar, como por liberar espécies reativas de oxigênio ou enzimas proteolíticas ou ambas, levando à lesão da parede do vaso sanguíneo (OFOSU-APPIAH et al., 1997).

A prevalência de HA na população idosa é bem elevada, alcançando cerca 50 a 75% dos indivíduos nessa faixa etária, como mostra uma série de grandes estudos realizados em vários países (FAGARD et al., 2002; TRENKWALDER et al., 1994). O tratamento monoterápico anti-hipertensivo de pacientes idosos geralmente inclui diuréticos (FOTHERBY et al., 1992) ou bloqueadores dos canais de cálcio (RAY et al., 1986).

1.4 Bloqueadores de Canais de Cálcio

Bloqueadores de canais de cálcio é a denominação geral de um grupo de fármacos não relacionados quimicamente que podem ser divididos segundo suas estruturas em: fenilalquilamina (exemplo: verapamil), diidropiridinas (exemplos: anlodipina, felodipina, isradipina, nicardipina, nifedipina, nimodipina, nisoldipina), benzotiazepina (exemplo: diltiazem) e diarilaminopropilamina (exemplo: bepridil). Seu mecanismo de ação, como o próprio nome indica, é por bloqueio de canais de cálcio, principalmente aqueles sensíveis à voltagem, do subtipo L. Com isso, o aumento da concentração intracelular de cálcio decorrente de estímulos elétricos despolarizantes é suprimido, com conseqüente prejuízo da contração de células musculares cardíacas e vasculares (HINTZE e VATNER, 1983; KERINS et al., 2003; VATNER e HINTZE, 1982). Por conseguinte, esses agentes promovem, em maior ou menor grau, relaxamento do músculo liso arterial e efeito inotrópico negativo. Além desses efeitos, o verapamil e o diltiazem deprimem a taxa de marca-passo do nodo sinusal e diminuem a velocidade de condução atrioventricular. Seus principais usos são no tratamento da angina, arritmias cardíacas e HA [ANTIHYPERTENSIVE AND LIPID LOWERING TREATMENT TO PREVENT HEART ATTACK TRIAL (ALLHAT) RESEARCH GROUP, 2002; KERINS et al., 2003; RUILOPE, 2002].

Além de seus efeitos sobre a PA, certos fármacos anti-hipertensivos, dentre eles alguns agentes bloqueadores dos canais de cálcio, promovem ações ditas antiinflamatórias, que podem ser importantes em condições clínicas em que haja algum tipo de processo inflamatório concomitante ao estado hipertensivo, comum em indivíduos em idade avançada.

Demonstrou-se que o verapamil reduz a resposta quimiotóxica de neutrófilos humanos a certas substâncias (PENNINGTON et al., 1986) e reduz a expressão de CAMs como VCAM-1 (YAMAGUCHI et al., 1997) em células endoteliais. Outro bloqueador de canais de cálcio, a nitrendipina diminui a expressão de VCAM-1 induzida por lipoproteína de baixa densidade (LDL) em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs). Semelhantemente, a lacidipina e a anlodipina inibem a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina em células endoteliais induzida por sinais pró-oxidantes, parecendo ser, ao menos em parte, por impedir a ativação do NF- κ B (COMINACINI et al., 1999). Além disso, a anlodipina atenua a migração

monocitária *in vitro*, sob condições de pressão normal ou elevada (SINGHAL et al., 1997).

1.5 Antiinflamatórios Não-Esteróides (AINEs)

AINEs estão entre os mais prescritos agentes farmacológicos na medicina. Em países desenvolvidos, essa classe de compostos representa 4 a 9% das prescrições (FRISHMAN, 2002). Eles são mais comumente usados para o tratamento de doenças músculo-esqueléticas. Seu mecanismo de ação antiinflamatório está relacionado à propriedade de inibir a enzima COX e, portanto, a produção de PGs e TXs. Contudo, isso também pode desencadear uma série de reações adversas como ulceração no trato gastrointestinal, hemorragias, insuficiência renal e agravamento do quadro de insuficiência cardíaca congestiva pré-existente. A população idosa (indivíduos acima de 60 anos), cuja incidência de queixas músculo-esqueléticas é elevada, está submetida a risco potencialmente maior, comparada a outras faixas etárias, à toxicidade de AINEs devido a suas condições médicas associadas (BERGER, 2001). Estimativas indicam que 12% dessa população associam medicamentos anti-hipertensivos e AINEs (FRISHMAN, 2002).

O bloqueio da formação de prostaglandinas E_2 (PGE_2) e I_2 (PGI_2) tem importante implicação em termos de controle da PA. Ambos são importantes vasodilatadores no leito vascular renal, liberados principalmente sob condições de fluxo sanguíneo renal baixo, servindo para compensar efeitos de agentes ou estímulos causadores de vasoconstrição renal (por exemplo, condições onde níveis de Ang II, potente vasoconstritor, ou atividade simpática estejam elevados), podendo também inibir a produção de endotelina-1 na vasculatura renal, diminuindo a reabsorção de sódio e água e, sistemicamente, reduzindo a resistência vascular periférica (FRISHMAN, 2002). Conseqüentemente, AINEs aumentam a vasoconstrição renal sob tais circunstâncias e aumentam a resistência periférica sistêmica. Além disso, PGE_2 inibe diretamente a reabsorção renal de sal e água, induzido por hormônio antidiurético (ADH). Então, a inibição de COX promove retenção de sal e água que pode, por sua vez, aumentar a PA. Contudo, PGs também estimulam liberação de renina da mácula densa que, por sua vez, estimula a produção de Ang II e aldosterona, hormônio promotor de retenção de sal e água

(RUOFF, 1998). Portanto, AINEs bloqueiam a secreção de renina compensando, ao menos parcialmente, a retenção de fluidos e aumento da PA.

Vários trabalhos têm apresentado a associação entre AINEs e aumento da PA. Em metanálise (54 estudos) realizada por Pope et al. (1993) englobando indivíduos hipertensos (definido como aqueles que estavam tomando medicamento anti-hipertensivo) a PA aumentou cerca de 3,7 mmHg após tratamento com naproxeno ou indometacina ($P < 0,0001$). Outra metanálise realizada por Johnson et al. (1994) (50 estudos) mostrou elevação maior em torno de 5,0 mmHg com o uso de AINEs, com marcante aumento em pesquisas onde a terapia anti-hipertensiva foi concomitante ao uso dos antiinflamatórios, sugerindo participação da interação medicamentosa nesse efeito. Também foi observado que pessoas idosas que fazem uso de AINEs são 1,4 vezes mais propensas a ter hipertensão do que aquelas que não os utilizam (RUOFF, 1998). Dada a prevalência e riscos ligados à hipertensão e a frequência do uso de AINEs, efeitos desses agentes na PA podem ter significantes implicações na saúde dos pacientes, visto que pequenos aumentos relativos da pressão (5 mmHg) em indivíduos no limite superior da normalidade (sistólica entre 130 e 139 mmHg e diastólica entre 80 e 85 mmHg) têm sido associados a grandes elevações no risco de derrame e insuficiência cardíaca (FRISHMAN, 2002).

Além de seu efeito sobre as PGs, AINEs influenciam a geração de ânions superóxido, migração de leucócitos polimorfonucleares e fagocitose, e podem seqüestrar radicais livres (BERGER, 2001). Esses efeitos, combinados com a observação que salicilatos não acetilados (que não inibem a COX) podem reduzir a inflamação em modelos animais, sugerem que a inibição da COX pode não ser o único mecanismo de ação dessa classe de agentes.

Díaz-González et al. (1995) observaram redução da aderência de neutrófilos ao endotélio com o uso de diferentes AINEs como consequência da redução da expressão de L-selectina na superfície leucocitária tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, AINEs também podem inibir a ativação de β_2 e β_3 integrinas em linfócitos T. Salicilatos inibem a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 induzido por TNF- α por bloquear a ativação de NF κ B e também parecem induzir a liberação de adenosina, que inibe a ativação de leucócitos, sua aderência ao endotélio e acúmulo no foco inflamatório. Indometacina, aceclofenaco e diclofenaco inibem a ativação da $\alpha_4\beta_1$ integrina (também conhecida como VLA-4, antígeno 4 muito lento) assim como a

interação célula endotelial-linfócito mediado por esse receptor de aderência (GONZALEZ-AMARO e SANCHEZ-MADRID, 2001). Diclofenaco promove ainda redução da quimiotaxia, da geração de radicais superóxido e da produção de proteases neutras (FRIMAN et al., 1986), além de diminuir também a expressão de várias outras moléculas de aderência como E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (SAKAI, 1996).

Poucos trabalhos mostram a ação combinada de AINEs com anti-hipertensivos sobre a função leucocitária. Dentre eles, foi observado que o verapamil aumenta o efeito antiinflamatório do diclofenaco *in vivo* em experimento envolvendo edema de pata e potencializa o efeito inibitório do diclofenaco na resposta de quimioluminescência de leucócitos polimorfonucleares humanos isolados *in vitro* (AL-TUWALJRI e MUSTAFA, 1992). Contudo, estudo realizado em nosso laboratório em ratos Wistar mostrou redução do rolamento, aderência e migração leucocitários por verapamil e diclofenaco isoladamente, no entanto, a combinação de ambos não promoveu aumento desse efeito (MARTINEZ et al., 1999). Mais recentemente, observamos também que o enalapril prejudica a diminuição do número de “rollers” promovido pelo diclofenaco em SHR, bem como a redução da expressão de P-selectina endotelial causada pelo diclofenaco (MARTINEZ et al., 2004); e que o losartan previne o efeito redutor da migração leucocitária em SHR provocado pelo diclofenaco por prejudicar a redução da expressão da integrina CD11/CD18 causada pelo antiinflamatório (MARTINEZ et al., 2005).

Tendo em vista que: 1) a anlodipina é um dos fármacos anti-hipertensivos mais prescritos para o controle dos níveis elevados de PA em idosos, possivelmente pelas poucas contra-indicações que possui (LYDTIN e TRENKWALDER, 1990); 2) a anlodipina integra os bloqueadores de canais de cálcio, classe de fármacos cuja redução da PA é menos afetada por AINEs (POLONIA et al., 1995); 3) a anlodipina promove alterações relevantes da expressão de moléculas de aderência; 4) a presença de processos inflamatórios pode ser bastante freqüente em indivíduos hipertensos, principalmente naqueles em faixa etária mais elevada; surge a necessidade de se avaliar o comportamento leucocitário com o uso concomitante da anlodipina e antiinflamatório não-esteroidal, no caso o diclofenaco, um dos mais utilizados no tratamento de doenças inflamatórias. Portanto, propomos estudar o efeito da interação anlodipina e diclofenaco sobre o comportamento leucocitário em SHR, bem como os mecanismos envolvidos nessa interação. Além disso,

objetivando verificar qual a relevância da redução da PA sobre a migração leucocitária, lançamos mão de duas estratégias distintas: 1) tratar um grupo de SHR com hidralazina, agente vasodilatador inespecífico, em duas doses, uma que não reduz a PA e outra que reduz a PA a níveis semelhantes aos observados após utilização da anlodipina, e verificar seu efeito sobre a migração leucocitária; 2) tratar um grupo de SHR com anlodipina numa dose que não reduzisse a PA. Ademais, para verificar se a interação também ocorre em condições de normotensão, tratamos ratos Wistar com os diferentes agentes farmacológicos utilizados no presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos usados neste estudo foram aprovados e realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo colégio brasileiro de experimentação animal – COBEA – e empregados pela comissão de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) (protocolo número 007/2004).

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (controle normotensos) e SHR machos pesando entre 250 e 350 g com 14 a 16 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do ICB-USP e condicionados no Biotério do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Farmacologia do ICB-USP. Os ratos tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos em sala com temperatura e umidade constantes (22 °C - 60% umidade), com ciclos claro/escuro de 12/12 h.

2.2 Grupos Experimentais e Tratamentos

Os diferentes grupos experimentais foram divididos segundo a administração dos seguintes agentes, durante o período de 15 dias, tanto em ratos Wistar quanto em SHR:

1. Veículo (cloreto de sódio 0,9%);
2. Diclofenaco de potássio 1,0 mg/kg (Cataflam® - Geigy, São Paulo, S. P., Brasil);
3. Anlodipina 10 mg/kg (Norvasc® - Pfizer, São Paulo, S. P., Brasil);
4. Diclofenaco de potássio 1,0 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg;
5. Hidralazina ~ 14 mg/kg (na água de beber) (Apresolina® - Novartis, São Paulo, S. P., Brasil).

Parte dos SHR foi ainda tratada com uma dose menor de anlodipina (3 mg/kg/dia, durante 15 dias) ou com uma dose menor de hidralazina (~ 3,5 mg/kg/dia, durante 15 dias, na água de beber) com o intuito de verificar, exclusivamente, os efeitos desses agentes sobre a aderência e migração leucocitárias, em dose que não reduz a PA. Para tanto, foi necessário determinar o efeito da dose reduzida desses fármacos sobre a PA e também sobre a massa corpórea, visto que o volume

de todos os fármacos administrados nesse estudo foi corrigido de 4 em 4 dias, de acordo com a evolução da massa corpórea dos ratos. Hidralazina ~ 14 mg/kg também é capaz de reduzir a PA de ratos Wistar, por isso adicionamos também o grupo de ratos Wistar tratados com hidralazina na dose de ~ 3,5 mg/kg/dia (durante 15 dias, na água de beber) e verificamos seu efeito sobre a aderência e migração leucocitárias, PA e massa corpórea.

Utilizamos o método de gavagem (solução inserida por via oral por meio de cânula - polietileno 0,6 mm) para a administração do veículo, diclofenaco, anlodipina, em ambas as doses, ou da associação, os quais foram administrados sempre ao mesmo horário do dia (à tarde). Os comprimidos de anlodipina foram quebrados, utilizando para isso gral e pistilo, e suspensos em solução de cloreto de sódio 0,9% à concentração final de 3,3 mg/mL, para a dose maior, e 1,0 mg/mL, para a dose menor. A solução de diclofenaco de potássio, por sua vez, foi diluída em solução de cloreto de sódio 0,9% até a concentração final de 1,0 mg/mL.

A hidralazina foi colocada na água de beber devido à necessidade de freqüente administração para a manutenção de seus níveis séricos eficazes, caso o fármaco fosse administrado por gavagem (de 4 a 6 vezes ao dia), segundo o seu fabricante. Os comprimidos de hidralazina foram processados de maneira similar aos da anlodipina contudo, a suspensão foi feita com a utilização de água potável e a concentração final foi de 80 mg/L para a dose maior, e 20 mg/L para a dose menor.

No grupo tratado com a associação medicamentosa foi dado um intervalo de 30 min entre a administração de cada fármaco, com o intuito de evitar interação farmacocinética na fase de absorção. A dose de diclofenaco foi estipulada em estudos anteriores do nosso laboratório (MARTINEZ et al., 2004, 2005), sendo aquela capaz de reduzir rolamento, aderência e migração leucocitários em SHR. Baseado em estudo da literatura (YOKOTA et al., 1998), segue a padronização da dose de anlodipina, sendo aquela que reduziu significativamente a PA no maior número de SHR testados. Segue também a padronização da concentração de hidralazina. A concentração de hidralazina igual a 80 mg/L (na água de beber) foi escolhida por promover redução de PA semelhante à observada após anlodipina 10 mg/kg na maioria dos SHR testados visto que, objetivamos com isso, verificar o efeito da diminuição da PA, independente de outros efeitos inerentes à anlodipina, sobre o comportamento leucocitário. Essa dose de hidralazina tem sido previamente demonstrada reduzir a PA em SHR (IGASE et al., 2005; YOU et al., 2005).

2.3 Determinação dos Consumos Hídrico e de Ração e do Volume Urinário

Com o intuito de verificar se a presença da hidralazina na água de beber poderia afetar o volume de água consumido, bem como o volume urinário e o consumo de ração, mantivemos os ratos tratados ou não com hidralazina, na maior dose utilizada, em gaiola metabólica por 4 dias (período de adaptação), seguindo-se a determinação de tais parâmetros no décimo primeiro dia de tratamento, sendo resultado de 24 h de observação (15:00 h às 15:00 h). Os resultados foram normalizados para 100 g de massa corpórea. O volume médio de líquido ingerido pelos ratos foi utilizado para o cálculo da dose média de hidralazina administrada por dia.

2.4 Avaliação da Pressão Arterial Indireta e Massa Corpórea

A PA caudal de SHR e ratos Wistar acordados foi determinada por método indireto (pletismografia de cauda) antes, no sétimo e décimo quinto dias de tratamento com diclofenaco, anlodipina - 3 ou 10 mg/kg - a combinação de diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg, hidralazina - ~ 3,5 e ~ 14 mg/kg - ou veículo. Os ratos foram colocados em estufas por 10 min a 40 °C, e em seguida em um cilindro de acrílico com abertura para a cauda e o focinho, sendo para isso condicionados à determinação da PA ao menos 4 dias antes das medidas definitivas, a fim de reduzir o estresse que interfere na aferição da mesma. Um oclisor e um sensor foram ajustados na porção proximal da cauda do rato, acoplados ao esfigmomanômetro elétrico PE-300 e conectados a computador e sistema eletrônico de medida (Powerlab/4S - ADInstruments Ltd., Castle Hill, Austrália). O valor final da PA representa a média de no mínimo três medidas consecutivas. Também foi realizada determinação da massa corpórea antes e após os tratamentos, tendo em vista a possibilidade de ocorrer efeito colateral indesejado do diclofenaco sobre o trato gastrointestinal, que poderia acarretar redução da ingestão de ração e perda de massa corpórea.

2.5 Microscopia Intravital na Microcirculação

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico 45 mg/kg, i.p. (Hypnol® - Cristália, São Paulo, S. P., Brasil). Após incisão longitudinal da pele e músculo da porção ventral do saco escrotal, a fáscia espermática interna da parede da câmara escrotal foi exteriorizada para estudo da microcirculação (FORTES et al., 1991).

Os ratos foram mantidos em chapa metálica aquecida a 37 °C que possui região transparente para transiluminação do tecido. A fáscia foi irrigada com solução de Ringer-Locke contendo 1% de gelatina cuja composição em milimolar (mM) é a seguinte: NaCl - 154,0; KCl - 5,6; CaCl₂.2 H₂O - 2,0; NaHCO₃ - 6,0 e glicose - 5,0 (produzidos pela Merck S.A., Ind. química, Rio de Janeiro, R. J., Brasil e Synth, São Paulo, S. P., Brasil), à temperatura de 37 °C (pH 7,2-7,4). Em seguida o tecido foi recoberto com fina camada de material plástico transparente para evitar seu ressecamento e mantido sob tais circunstâncias por 30 min, visando cumprir período de estabilização inicial pós-cirúrgico da preparação. O sistema é constituído de circuito fechado de TV que consiste em câmera (Samsung Digital Color, modelo SHC-410NAD, Aerospace Samsung Ind. LTD., Korea) acoplada a microscópio óptico (Triocular Reichert Diastar, modelo 420, Cambridge Instruments Inc., Nova Iorque, EUA) para facilitar a observação da imagem ampliada (2500 vezes) na tela do monitor de televisão, o qual está conectado a aparelho de vídeo cassete. A realização da medida eletrônica do diâmetro interno das vênulas é feita utilizando-se sistema de medida (Image Shearing Monitor, model 908, PTM, Califórnia, EUA) acoplado à câmera de televisão (Figura 2).

O grau de lesão provocado na preparação foi estimado ao final dos experimentos, quando o tecido foi corado com azul de toluidina por 2 min para verificação da desgranulação dos mastócitos.

Após o fim de cada experimento os ratos foram sacrificados por excesso de anestésico e seus estômagos analisados macroscopicamente quanto à presença de úlceras gástricas.

Figura 2: Representação do sistema de microscopia intravital, constituído de chapa metálica aquecida a 37 °C, que possui região transparente para transiluminação do tecido, circuito fechado de TV, que consiste em câmera acoplada a microscópio óptico, para facilitar a observação da imagem ampliada (2500 vezes) na tela do monitor de televisão, o qual se encontra conectado a aparelho de vídeo cassete. A realização da medida eletrônica do diâmetro interno das vênulas é feita utilizando-se sistema de medida acoplado à câmera de televisão.

2.5.1 Comportamento Leucocitário

SHR e ratos Wistar tratados com diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg, a combinação de diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg, hidralazina ~ 14 mg/kg ou veículo foram avaliados quanto à interação dos leucócitos com a superfície luminal do endotélio venular - processos de rolamento, aderência e migração - em segmentos de vênulas de segunda ordem, com diâmetro interno de 14 a 18 μm . SHR tratados com anlodipina 3 mg/kg ou hidralazina ~ 3,5 mg/kg, bem como ratos Wistar tratados com hidralazina ~ 3,5 mg/kg, foram também testados quanto ao efeito sobre a aderência e migração leucocitárias. A avaliação do rolamento leucocitário foi realizada na ausência de estímulo inflamatório exógeno visto que foi demonstrado que a cirurgia para exposição do tecido já é suficiente para estimular o endotélio e induzir o processo de rolamento (FIEBIG et al., 1991; MARTINEZ et al., 1999). Os leucócitos que se movimentam na periferia do fluxo sanguíneo axial numa faixa de 100 μm de extensão, em contato com o endotélio, são considerados “rollers”, e seu número foi determinado durante o período de 10 min (PANES et al., 1996). O tempo que um “roller” leva para percorrer 100 μm de extensão venular foi determinado e

calculada a velocidade de rolamento (em $\mu\text{m/s}$), sendo adotado como valor final a média da velocidade de dez leucócitos (PANES et al., 1996). O número de células que aderem ao endotélio (“stickers”), determinado em 100 μm de extensão de vênula, e o número de leucócitos migrados para uma área correspondente a 2500 μm^2 de tecido conjuntivo, próximo à vênula, foram determinados 2 h após injeção subcutânea contendo $\text{TNF-}\alpha$ 5 ng/0,1mL (R&D Systems, Mineápolis, EUA) na bolsa escrotal dos ratos (MARTINEZ et al., 2004, 2005). As áreas escolhidas foram gravadas em videoteipe para posterior análise do número de células aderidas e migradas, que corresponderam à média das células obtidas a partir das imagens captadas de pelo menos três vênulas diferentes por rato.

A fásia espermática contralateral foi utilizada como controle da eficácia do estímulo inflamatório local, visto que se mantinha livre de aderência e migração leucocitárias, ao contrário do que era observado na região que foi submetida ao estímulo inflamatório. Após o estudo do comportamento leucocitário, os ratos não foram utilizados posteriormente em qualquer experimento.

2.5.2 Velocidade do Fluxo Sangüíneo e Taxa de Atrito Venular (“Shear Rate”)

A velocidade do fluxo sanguíneo – V_{RBC} – foi medida em SHR e ratos Wistar não estimulados e tratados com diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco associado à anlodipina 10 mg/kg, hidralazina ~ 14 mg/kg ou veículo, utilizando-se velocímetro óptico (Optical Doppler Velocimeter - Microcirculation Research Institute Texas A & M University College Station, Texas, EUA) acoplado ao microscópio óptico, semelhante ao sistema descrito anteriormente. A taxa de atrito venular (g), por sua vez, foi calculada a partir da seguinte equação: $g = 8 \times (V_{\text{mean}}/D_v)$, onde $V_{\text{mean}} = V_{\text{RBC}}$, para vasos com diâmetro até 25 μm ; D_v = diâmetro venular (PANES et al., 1996). Foram utilizadas vênulas pós-capilares da fásia espermática interna com diâmetros que variaram entre 14 e 18 μm (vênulas de segunda ordem). Esses animais não foram utilizados posteriormente para realização de qualquer experimento.

2.6 Leucogramas Total e Diferencial

Amostras de sangue foram retiradas da cauda de SHR e ratos Wistar não anestesiados e não estimulados, submetidos aos seguintes tratamentos: diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco associado à anlodipina 10 mg/kg, hidralazina ~ 14 mg/kg ou veículo. Tecidos desses animais foram posteriormente retirados e utilizados para realização dos experimentos de imunohistoquímica e das reações de transcriptase reversa (RT) seguida da reação de polimerase em cadeia (PCR). Os ratos foram mantidos em contentores com abertura para o focinho e a cauda. Realizamos o aquecimento da cauda durante cerca de 30 seg, à temperatura de 40°C, previamente ao corte da extremidade da mesma (1 cm de distância da ponta da cauda) e coletamos o sangue. Tal procedimento foi realizado sempre no mesmo horário do dia (entre 10:00 h e 12:00 h). As amostras de sangue foram colocadas em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Labor Vacuum, São Paulo, S. P., Brasil) e suavemente homogeneizadas em agitador. Parte de cada amostra foi diluída em solução de lise de hemácias Cellmilise II® (CELM, São Paulo, S. P., Brasil) para determinação do número de leucócitos total em contador automático (CELM CC-530, CELM). A outra parte foi utilizada para a contagem diferencial utilizando esfregaços das amostras de sangue, os quais foram fixados em lâminas e corados com kit corante Instant-Prov® (Newprov, Paraná, Brasil). Em microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100 vezes), foi contado o número de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos.

2.7 Determinação das Concentrações Plasmáticas de Diclofenaco e Anlodipina

Cerca de 500 µL de sangue foi obtido do sinus orbital de SHR e ratos Wistar não-anestesiados antes, bem como, 15 min, 45 min, 6 h e 24 h após o início do tratamento, por via oral, com veículo, diclofenaco de potássio 1 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg ou diclofenaco 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg, tempos esses escolhidos com o intuito de se abranger as concentrações plasmáticas máximas dos agentes. Realizamos também a dosagem após 24 h de administração visto que todos os experimentos realizados nesse estudo transcorreram até no máximo esse intervalo de tempo. Testes prévios foram realizados e informações da literatura

obtidas de forma a precisar quais os tempos mais adequados para a coleta do sangue (FUJIMURA et al., 1993; LALA et al., 2004). O sangue foi colocado em tubos heparinizados e subseqüentemente centrifugado (1500 rpm, durante 10 min a 4 °C), sendo o plasma armazenado a -20 °C até sua utilização. As concentrações plasmáticas de diclofenaco e anlodipina foram determinadas por método analítico baseado em cromatografia líquida com ionização por eletro spray, utilizando íon com carga positiva, acoplado a sistema de espectroscopia de massa “tandem”, de acordo com o descrito por Oliveira et al. (2003) e Padua et al. (2004). As amostras de sangue foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas (3000 rpm durante 5 min a 4 °C) com o intuito de precipitar algum resíduo sólido da solução. Os analitos e os padrões internos (diclofenaco de potássio, Medley Indústria Farmacêutica, São Paulo, S. P., Brasil e felodipina, Astra-Zeneca, São Paulo, S. P., Brasil) foram extraídos das amostras de plasma (150 µL) por extração do tipo líquido-líquido utilizando solução de dietiléter-diclorometano (60/40, vol/vol), seguindo-se cromatografia em coluna analítica C18 (Alltech, Prevail, C18, 3 µm, 100 x 4,6 mm). Foram duas as soluções constituintes da fase móvel: 1) Mistura acetonitrila-água (95/5, vol/vol), mais 5 mM de formiato de amônio e 10 mM de ácido fórmico; 2) Água mais 5 mM de formiato de amônio e 10 mM de ácido fórmico. O método teve tempo de corrida cromatográfico de 4,6 min. Seguiu-se a detecção em espectrômetro de massa “tandem” (Micromass triple quadrupole, Manchester, Reino Unido) por monitoramento de reação múltipla. Acetonitrila (HPLC-grade), diclorometano e dietiléter (para análise) foram comprados da Mallinckrodt (Missouri, EUA). Ácido fórmico e formiato de amônio (para análise) foram comprados da Merck (Rio de Janeiro, R. J., Brasil). Água ultra-pura foi obtida por sistema de ultra-filtração Elga UHQ (Elga, Reino Unido). Os resultados foram dispostos como concentração plasmática (ng/mL) dos fármacos em relação ao tempo e área sob a curva (AUC) da concentração plasmática (ng/mL) em relação ao tempo (h). Após a realização desse experimento esses ratos foram submetidos aos vários tratamentos, antiinflamatório e anti-hipertensivo descritos anteriormente, e tecidos desses animais foram retirados e utilizados para realização dos experimentos de imunohistoquímica e RT-PCR.

2.8 Preparação do Tecido e Reação de Imunohistoquímica

SHR e ratos Wistar não estimulados tratados com diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco associado à anlodipina 10 mg/kg, hidralazina ~ 14 mg/kg ou veículo foram anestesiados com pentobarbital sódico (45 mg/kg, i.p.), seguindo-se realização de procedimento cirúrgico para coleta dos testículos, os quais foram imediatamente colocados em banho de hexana (Synth) gelada, com o intuito de crioprotégê-los. Os mesmos foram acondicionados em tubos Falcon e imersos em nitrogênio líquido para rápido congelamento. A seguir, foram armazenados em freezer -80 °C até realização dos cortes, que foram feitos em criostato (Leica Microsystem, Heidelberg, Alemanha) a -25 °C (cortes com 8 µm de espessura) e depositados em lâminas silanizadas. Seguiu-se banho em acetona (Synth) gelada, -22 °C durante 10 min, para fixação dos mesmos e armazenamento em freezer a -20 °C até utilização.

Foram utilizados anticorpos monoclonais, já conjugados com biotina contra IgG de rato, no caso dos anti-ICAM-1 e anti-PECAM-1 (BD-Pharmingen, Califórnia, EUA), e cujo anticorpo secundário é que é conjugado com biotina, no caso do anti-P-selectina (BD-Pharmingen). Lavamos as lâminas em tampão fosfato-salina (PBS) 0,1 M durante 5 min, diluímos os anticorpos em PBS com Tween 20 a 0,3% (na proporção de 1:10 para anti-ICAM-1, 1:100 para anti-P-selectina e 1:1000 para anti-PECAM-1) e os colocamos sobre os cortes para incubação por período aproximado de 18 h a 4 °C em câmara úmida. À solução contendo o anticorpo primário anti-P-selectina foi adicionado soro “goat” na concentração final de 5% com o intuito de bloquear reação inespecífica proveniente de ligação do anticorpo secundário. Realizamos reações controle substituindo o anticorpo por PBS 0,1M com Tween 20 a 0,3%. Lavamos as lâminas três vezes em PBS 0,1 M.

No caso da reação para determinação da P-selectina, incubamos os cortes com anticorpo secundário (anti-rabbit 1:1000, BD-Pharmingen) durante 1 h em temperatura ambiente dentro de câmara úmida. Seguiu-se lavagem, três vezes, em PBS 0,1 M.

A seguir, incubamos os cortes em solução de avidina/biotina - kit ABC - (diluída em PBS na proporção de 1:100 para A e 1:100 para B) (Vectashield, VECTOR laboratories, Califórnia, EUA) por 1 h em temperatura ambiente e câmara úmida. Após esse período, fizemos imersão dos cortes três vezes em banho de PBS

0,1 M. Posteriormente, procedemos a reação com 1 mL de diaminobenzidina (DAB) 0,5 mg/mL na presença de 60 μ L H₂O₂ para cada 100 mL de solução de PBS 0,1 M, durante os seguintes tempos aproximados: 45 seg para ICAM-1, 2 min para PECAM-1 e 45 seg para P-selectina. Seguiu-se lavagem das lâminas duas vezes em PBS 0,1 M e uma vez em água destilada, durante 5 min cada. Esperamos a secagem das lâminas e as montamos, utilizando lamínulas, para observação ao microscópio.

Realizamos então, análise comparativa e quantificação de ICAM-1, PECAM-1 e P-selectina por densidade de imagens em “software” KS 300 3.0 para microscópio E-800 da Nikon (Zeiss, Alemanha), sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias.

2.9 Obtenção do RNAm, Reação de RT e PCR em Tempo Real

Durante anestesia com pentobarbital sódico (45 mg/kg, i.p.) as fâscias espermáticas de SHR e ratos Wistar não estimulados, tratados com diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco associado à anlodipina 10 mg/kg, hidralazina ~ 14 mg/kg ou veículo foram dissecadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. O RNA celular total foi isolado utilizando o reagente TRizol[®] (Invitrogen Co., San Diego, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Utilizamos DNase I para digerir o DNA que ocasionalmente pudesse estar presente na nossa amostra de RNA após o processo de extração. Realizamos a síntese da fita simples de cDNA - reação de RT - a partir de 2 μ g do RNA total, utilizando a enzima SuperScript II (Invitrogen) e adicionamos RNaseOUT (Invitrogen) para proteger o RNA durante esse processo. A amplificação do cDNA foi realizada usando os seguintes “primers”: 5'- CCT CTT GCG AAG ACG AGA AC -3' (sense) e 5'- ACT CGC TCT GGG AAC GAA TA -3' (anti-sense) (198 pb) para ICAM-1 de rato, 5'- TAA TCC CCC GCA GTG TAA AG -3' (sense) e 5'- AGG TTG GCA ATG GTT CAC TC -3' (anti-sense) (199 bp) para P-selectina de rato, 5'- GAA GGT TTC TGA GCC CAG TG -3' (sense) e 5'- TCA AGG GAG GAC ACT TCC AC -3' (anti-sense) (93 bp) para PECAM-1 de rato e 5'- AAG ATT TGG CAC CAC ACT TTC TAC A -3' (sense) e 5'- CGG TGA GCA GCA CAG GGT -3' (anti-sense) para β -actina de rato. A quantidade de cDNA foi analisada por PCR em tempo real utilizando o reagente Platinum[®] SYBR[®] green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). As reações de PCR foram

realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Sidney, Austrália).

As condições do PCR foram: 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C seguindo-se 30 ciclos na seguinte seqüência: 95 °C por 15 seg, 60 °C por 1 min e 72 °C por 15 seg. A especificidade da reação com SYBR[®] green foi confirmada pela análise da curva de dissociação tomando como base a temperatura de dissociação - “melting point”. A expressão gênica foi quantificada utilizando o cálculo do ΔC_t (“cycle threshold”) (PFAFFL, 2001). O cDNA sintetizado a partir do mRNA da β -actina foi utilizado para normalização. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias relativas à variação da expressão de RNAm.

2.10 Citometria de Fluxo

Após anestesia com pentobarbital sódico (45 mg/kg, i.p.) os ratos foram submetidos à incisão longitudinal da pele e músculo da porção ventral do abdomen, para exposição da aorta abdominal, de onde foi retirado sangue (aproximadamente 6 mL) de SHR e ratos Wistar não estimulados, tratados com diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco associado à anlodipina 10 mg/kg, hidralazina ~ 14 mg/kg ou veículo. Tubos contendo EDTA (Labor Vacuum) foram utilizados na coleta do sangue, o qual foi posteriormente transferido para tubos Falcon, seguindo-se a lise dos eritrócitos, utilizando solução de cloreto de amônio (Synth) 130 mM, na proporção de 1:7 (sangue:solução de cloreto de amônio, vol/vol), durante aproximadamente 5 min, a 4 °C. As amostras foram então centrifugadas (1200 rpm, 5 min a 4 °C), o sobrenadante descartado e o pellet de leucócitos obtido, ressuspensão em 1 mL de tampão Hanks (pH=7,4), cuja composição em milimolar (mM) é a seguinte: NaCl - 137,0; KCl - 5,4; Na₂HPO₄ - 0,7; KH₂PO₄ - 0,7 e glicose - 5,5 (produzidos pela Merck S.A. e Synth), adicionado a 27,5 mM de Tris base e 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) (produzidos pela Sigma-Aldrich Co., Missouri, Estados Unidos). Procedemos à contagem do número de leucócitos em câmara de Neubauer, após solubilizar 10 μ L da amostra em 190 μ L de líquido de Türk (proporção 1:20, amostra:líquido de Türk, vol/vol). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1200 rpm, 10 min a 4 °C) e ressuspensas em tampão Hanks com Tris e BSA em volume suficiente para se obter concentração final igual a $11,11 \times 10^6$ leucócitos/mL. Cada amostra foi então dividida em três grupos (90 μ L de amostra

cada, equivalente a aproximadamente 1×10^6 células), sendo um incubado com anticorpo anti-L-selectina (proporção de 1:20, anti LECAM-1 hamster IgG - FITC - BD), o segundo incubado com anticorpo anti CD18 (proporção de 1:100, anti CD18 mouse IgG-1 - FITC - BD) e o terceiro incubado apenas com o veículo utilizado para diluir os anticorpos, Hanks com Tris e BSA (controle negativo). A incubação foi feita durante 30 min, em geladeira, protegida da luz. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de Hanks com Tris e BSA, centrifugadas (1200 rpm, 10 min a 4 °C) e ressuspensas em 500 µL de solução de Hanks com Tris e BSA para aquisição e leitura dos resultados, utilizando citômetro de fluxo (FACS Calibur™, BD). Foi analisada a população de granulócitos, separada em uma janela contendo cerca de 5000 eventos, utilizando o “software” Cell Quest (BD), sendo os resultados expressos em intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias).

2.11 Análise Estatística

Os resultados são expressos como média $\pm$ epm, analisados utilizando análise de variância “One-way” (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas, além do teste “Student’s” t não pareado, utilizado na análise dos resultados das concentrações plasmáticas de diclofenaco e anlodipina. O nível de significância adotado tem como limite 5%.

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 Massa Corpórea

As massas corpóreas dos SHR antes e ao final dos tratamentos (15 dias), bem como o ganho de massa corpórea após administração de diclofenaco, anlodipina, nas doses de 3 e 10 mg/kg, a associação diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg, e hidralazina, nas doses de ~ 3,5 e ~ 14 mg/kg, foram semelhantes as dos ratos tratados com veículo, como demonstrado na tabela 2. Padrão semelhante de resposta foi observado nos ratos Wistar (Tabela 3). Análise macroscópica do estômago dos animais dos diferentes grupos não demonstrou a presença de ulcerações ou processos inflamatórios locais.

Tabela 2 – Massa corpórea absoluta e ganho de massa corpórea, em g, de SHR machos antes e após os seguintes tratamentos: veículo, diclofenaco de potássio 1 mg/kg, anlodipina 3 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg, por via oral, e hidralazina ~ 3,5 mg/kg e ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante o período de 15 dias.

GRUPOS	Antes do tratamento ^a	15º dia de tratamento ^a	Ganho de massa corpórea ^a
Veículo (n=12)	287,3 ± 5,1	308,0 ± 5,0	20,8 ± 1,7
Diclofenaco 1 mg/kg (n=14)	284,5 ± 5,0	305,9 ± 5,7	18,7 ± 2,4
Anlodipina 3 mg/kg (n=07)	275,6 ± 7,8	290,3 ± 5,8	14,7 ± 3,0
Anlodipina 10 mg/kg (n=14)	281,3 ± 5,8	297,5 ± 5,7	16,3 ± 2,2
Diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (n=09)	279,8 ± 7,1	293,9 ± 6,4	14,1 ± 1,5
Hidralazina ~ 3,5 mg/kg (n=06)	260,9 ± 3,9	287,4 ± 4,8	23,3 ± 3,8
Hidralazina ~ 14 mg/kg (n=11)	275,7 ± 6,9	292,1 ± 7,1	17,8 ± 1,9

a = Resultados apresentados como média ± epm; n significa o número de ratos testados.

Tabela 3 – Massa corpórea absoluta e ganho de massa corpórea, em g, de ratos Wistar machos antes e após os seguintes tratamentos: veículo, diclofenaco de potássio 1 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg, por via oral, ou hidralazina ~ 3,5 mg/kg e ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante o período de 15 dias.

GRUPOS	Antes do tratamento ^a	15º dia de tratamento ^a	Ganho de massa corpórea ^a
Veículo (n=06)	313,9 ± 15,9	321,0 ± 16,8	7,1 ± 3,3
Diclofenaco 1 mg/kg (n=12)	324,0 ± 10,9	329,7 ± 11,3	5,6 ± 3,1
Anlodipina 10 mg/kg (n=15)	314,1 ± 10,1	315,9 ± 9,9	1,8 ± 2,7
Diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (n=15)	321,9 ± 8,3	324,9 ± 9,5	3,0 ± 4,1
Hidralazina ~ 3,5 mg/kg (n=04)	318,7 ± 16,4	324,6 ± 16,9	6,0 ± 4,4
Hidralazina ~ 14 mg/kg (n=08)	330,4 ± 9,2	340,8 ± 10,6	10,4 ± 2,1

a = Resultados apresentados como média ± epm; n significa o número de ratos testados.

3.2 Consumos Hídrico e de Ração e Determinação do Volume Urinário

A dissolução de hidralazina, na maior dose utilizada (~ 14 mg/kg), na água de beber tanto de SHR quanto de ratos Wistar não alterou os consumos hídrico e de ração ou o volume urinário de 24 h comparado aos ratos que tomaram água na ausência de hidralazina (Tabela 4).

Tabela 4 – Consumos hídrico e de ração e determinação do volume urinário de SHR e ratos Wistar machos durante o período de 24 h, mediante administração ou não de hidralazina ~ 14 mg/kg, dissolvida na água de beber. Os resultados foram normalizados para 100 g de massa corpórea.

GRUPOS	Consumo hídrico (mL) ^a	Consumo de ração (g) ^a	Volume urinário (mL) ^a
SHR			
Água (n=10)	17,2 ± 1,9	10,6 ± 0,9	3,6 ± 1,0
Hidralazina ~ 14 mg/kg em solução aquosa (n=09)	20,8 ± 1,7	9,7 ± 0,9	5,8 ± 1,2
Wistar			
Água (n=06)	13,7 ± 1,3	8,3 ± 1,1	2,8 ± 0,9
Hidralazina ~ 14 mg/kg em solução aquosa (n=11)	14,2 ± 1,0	8,8 ± 0,9	3,5 ± 0,8

a = Resultados apresentados como média ± epm; n significa o número de animais testados.

3.3 Pressão Arterial Caudal

Anlodipina na dose de 3 mg/kg, administrada por via oral aos SHR durante 15 dias, não foi capaz de promover redução significativa na PA caudal. No entanto, na dose de 10 mg/kg, causou queda considerável da PA já após 24 h de tratamento, efeito também observado após 3, 10 e 15 dias de administração, sendo essa, portanto, a dose selecionada do anti-hipertensivo para o presente estudo (Figura 3).

Da mesma forma, hidralazina na dose de ~ 3,5 mg/kg não reduziu a PA caudal de SHR após 15 dias de administração, ao contrário do que foi observado quando os ratos foram tratados com hidralazina na dose de ~ 14 mg/kg, em que houve redução considerável da PA (Figura 4).

O tratamento dos SHR com diclofenaco de potássio durante 15 dias não interferiu com a PA caudal quando comparado ao grupo que recebeu veículo; por sua vez, anlodipina 10 mg/kg, como mencionado anteriormente, reduziu a PA desses ratos de maneira significativa. Ao associar diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg, não foi observada diferença na redução da PA quando comparado ao grupo

tratado apenas com anlodipina 10 mg/kg. O tratamento com hidralazina ~ 14 mg/kg reduziu a PA a níveis semelhantes aos observados após tratamento com anlodipina 10 mg/kg (Figura 5).

Hidralazina na dose de ~ 3,5 mg/kg não reduziu a PA caudal de ratos Wistar após 15 dias de administração. Na dose de ~ 14 mg/kg, houve redução considerável desse parâmetro nesses ratos (Figura 6).

A PA caudal dos ratos Wistar tratados com diclofenaco de potássio, anlodipina 10 mg/kg ou a associação de ambos durante 15 dias não diferiu daquela dos ratos tratados com veículo. Contudo, o tratamento com hidralazina na dose de ~ 14 mg/kg, reduziu significativamente a PA nesses ratos (Figura 7).

Figura 3: Pressão arterial caudal de SHR machos tratados com anlodipina 3 mg/kg ou anlodipina 10 mg/kg, por via oral (gavagem), durante o período de 15 dias. n significa o número de animais testados; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs antes do tratamento.

Figura 4: Pressão arterial caudal de SHR machos tratados com hidralazina ~ 3,5 mg/kg ou hidralazina ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante o período de 15 dias. n significa o número de animais testados; *** $P < 0,001$ vs antes do tratamento.

Figura 5: Pressão arterial caudal de SHR machos após os seguintes tratamentos: veículo, diclofenaco de potássio 1 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg, por via oral (gavagem), ou hidralazina ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante o período de 15 dias. n significa o número de animais testados; * $P < 0,05$ vs grupo tratado com veículo.

Figura 6: Pressão arterial caudal de ratos Wistar machos tratados com hidralazina ~ 3,5 mg/kg ou hidralazina ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante o período de 15 dias. n significa o número de animais testados; * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs antes do tratamento.

Figura 7: Pressão arterial caudal de ratos Wistar machos após os seguintes tratamentos: veículo, diclofenaco de potássio 1 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg, diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg, por via oral (gavagem), ou hidralazina ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante o período de quinze dias. n significa o número de animais testados; *** $P < 0,001$ vs grupo tratado com veículo.

3.4 Diâmetro Venular

O diâmetro das vênulas de segunda ordem presentes na fáscia espermática dos SHR tratados durante 15 dias com diclofenaco de potássio ($15,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $n=8$) ou anlodipina 10 mg/kg ($16,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$, $n=8$), isoladamente ou associados ($16,1 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $n=7$), bem como com hidralazina ~ 14 mg/kg ($15,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$, $n=11$), foi semelhante àquele do grupo que recebeu veículo ($16,4 \pm 0,6 \mu\text{m}$, $n=8$).

Tratamento dos ratos Wistar durante 15 dias com diclofenaco de potássio ($15,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $n=7$) ou anlodipina 10 mg/kg ($18,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $n=7$), ou a associação de ambos ($16,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$, $n=8$), bem como com hidralazina ~ 14 mg/kg ($16,4 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $n=8$), também não alterou o diâmetro venular quando comparado aos ratos tratados com veículo ($17,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$, $n=9$).

3.5 Rolamento Leucocitário

O tratamento de SHR machos com diclofenaco de potássio durante 15 dias reduziu significativamente o número de leucócitos rolando, contados durante o intervalo de 10 min, na superfície endotelial de vênulas da fáscia espermática comparado ao grupo que recebeu veículo. Por sua vez, a administração de anlodipina 10 mg/kg pelo mesmo período de tempo não foi capaz de promover alteração do número de “rollers” nesses ratos. Além disso, a anlodipina 10 mg/kg, quando associada ao diclofenaco, não interferiu na diminuição do número de “rollers” produzido pelo antiinflamatório (Figura 8A). Semelhante ao observado após tratamento com anlodipina, o número de “rollers” não foi alterado após tratamento com hidralazina ~ 14 mg/kg (Figura 8B).

O número de “rollers”, contados durante o período de 10 min, em vênulas da fáscia espermática de ratos Wistar machos tratados com diclofenaco de potássio ou anlodipina 10 mg/kg ou a associação desses dois fármacos durante 15 dias, não foi diferente daquele dos ratos tratados com veículo (Figura 9A). O tratamento desses ratos com hidralazina ~ 14 mg/kg também não modificou o número de “rollers” (Figura 9B).

Figura 8: Rolamento leucocitário, contado durante o intervalo de 10 min, em vênulas da fáscia espermática (14 a 18 μ m de diâmetro) de SHR machos submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo (□), diclofenaco de potássio 1 mg/kg (□), anlodipina 10 mg/kg (□) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg (■), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo (□) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (■), na água de beber, durante 15 dias. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra.
 ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs grupo tratado com veículo.

Figura 9: Rolamento leucocitário, contado durante o intervalo de 10 min, em vênulas da fáscia espermática (14 a 18 μ m de diâmetro) de ratos Wistar machos submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo (□), diclofenaco de potássio 1 mg/kg (□), anlodipina 10 mg/kg (□) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg (■), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo (□) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (■), na água de beber, durante 15 dias. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra.

3.6 Velocidade do Rolamento Leucocitário

O tratamento dos SHR com diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg, administrados isoladamente ou associados, não promoveu modificação da velocidade dos “rollers” comparado aos ratos tratados apenas com veículo, em vênulas da fáscia espermática (Figura 10A). A administração de hidralazina ~ 14 mg/kg também não alterou a velocidade dos leucócitos em vênulas da fáscia espermática de SHR (Figura 10B).

Semelhante ao observado em SHR, a administração de diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg, combinados ou não, a ratos Wistar não alterou a velocidade dos “rollers” em vênulas da fáscia espermática (Figura 11A). Além disso, esse parâmetro também não foi modificado no grupo de ratos Wistar tratado com hidralazina ~ 14 mg/kg (Figura 11B).

Figura 10: Velocidade do rolamento leucocitário, calculado a partir do tempo necessário para que o leucócito percorra 100 μm de extensão de vênulas da fáscia espermática (14 a 18 μm de diâmetro), de SHR machos submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo ($\square$), diclofenaco de potássio 1 mg/kg ($\square$), anlodipina 10 mg/kg ($\square$) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg ($\square$), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo ($\square$) ou hidralazina ~ 14 mg/kg ($\blacksquare$), na água de beber, durante 15 dias. Foi considerado como valor final a média da velocidade de dez leucócitos. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra.

Figura 11: Velocidade do rolamento leucocitário, calculado a partir do tempo necessário para que o leucócito percorra 100 μm de extensão de vênulas da fáscia espermática (14 a 18 μm de diâmetro), de ratos Wistar machos submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo ($\square$), diclofenaco de potássio 1 mg/kg ($\square$), anlodipina 10 mg/kg ($\square$) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg ($\blacksquare$), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo ($\square$) ou hidralazina ~ 14 mg/kg ($\blacksquare$), na água de beber, durante 15 dias. Foi considerado como valor final a média da velocidade de dez leucócitos. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra.

3.7 Aderência Leucocitária

O tratamento dos SHR com diclofenaco de potássio, associado ou não à anlodipina 10 mg/kg, reduziu o número de leucócitos aderidos ao endotélio de vênulas da fáscia espermática após estímulo local com $\text{TNF-}\alpha$ contudo, com a associação houve prejuízo do efeito redutor do diclofenaco. Assim como o diclofenaco, o tratamento com anlodipina 10 mg/kg reduziu o número de leucócitos aderidos ao endotélio após estímulo com $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 12A). O tratamento com hidralazina ~ 14 mg/kg também foi capaz de reduzir o número de leucócitos aderidos (Figura 12B). Contudo, quando anlodipina foi administrada na dose de 3 mg/kg a SHR, não foi observada diferença na aderência leucocitária comparada ao veículo (Figura 12C), diferente do que aconteceu quando se reduziu a dose de hidralazina (~ 3,5 mg/kg) em que, ainda assim, foi observada redução do número de leucócitos aderidos (Figura 12D).

O diclofenaco de potássio, mas não a anlodipina 10 mg/kg, reduziu o número de leucócitos aderidos ao endotélio de vênulas da fáscia espermática de ratos Wistar após estímulo local com $\text{TNF-}\alpha$. Contudo, tal redução não foi observada no grupo em que foram administrados o antiinflamatório e o anti-hipertensivo combinados

(Figura 13A). O tratamento dos ratos Wistar com hidralazina nas doses de ~ 14 mg/kg (Figura 13B) ou ~ 3,5 mg/kg (Figura 13C) não alterou o número de leucócitos aderidos ao endotélio comparado aos ratos tratados com veículo.

Figura 12: Aderência leucocitária determinada em 100 μ m de extensão de vênulas (14 a 18 μ m de diâmetro) da fáscia espermática de SHR machos 2 h após injeção local de $\text{TNF-}\alpha$ (5 ng/0,1 mL). Os ratos foram submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo ($\square$), diclofenaco de potássio 1 mg/kg ($\square$), anlodipina 10 mg/kg ($\square$) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg ($\blacksquare$), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo ($\square$) ou hidralazina ~ 14 mg/kg ($\blacksquare$), na água de beber, durante 15 dias; **C)** veículo ($\square$) ou anlodipina 3 mg/kg ($\boxtimes$), por via oral, durante o período de 15 dias; **D)** veículo ($\square$) ou hidralazina ~ 3,5 mg/kg (||||), na água de beber, durante o período de 15 dias. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs grupo tratado com veículo. # $P < 0,05$ vs grupo tratado com diclofenaco.

Figura 13: Aderência leucocitária determinada em 100 μm de extensão de vênulas (14 a 18 μm de diâmetro) da fáscia espermática de ratos Wistar machos 2 h após injeção local de $\text{TNF-}\alpha$ (5 ng/0,1 mL). Os ratos foram submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo ($\square$), diclofenaco de potássio 1 mg/kg ($\square$), anlodipina 10 mg/kg ($\square$) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg ($\blacksquare$), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo ($\square$) ou hidralazina ~ 14 mg/kg ($\blacksquare$), na água de beber, durante 15 dias. **C)** veículo ($\square$) ou hidralazina ~ 3,5 mg/kg (||||), na água de beber, durante o período de 15 dias. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra.
 ** $P < 0,01$ vs grupo tratado com veículo.

3.8 Migração Leucocitária

O tratamento dos SHR com diclofenaco de potássio associado ou não à anlodipina 10 mg/kg reduziu o número de leucócitos migrados para o interstício em área correspondente a 2500 μm^2 de extensão, próxima a vênulas da fáscia espermática, 2 h após estímulo local com $\text{TNF-}\alpha$. A associação do diclofenaco com anlodipina 10 mg/kg provocou redução da migração leucocitária de intensidade inferior à observada no grupo de SHR tratados apenas com diclofenaco. Assim como o diclofenaco, o tratamento com anlodipina 10 mg/kg reduziu o número de leucócitos migrados para o interstício após estímulo com $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 14A). O tratamento de SHR com hidralazina ~ 14 mg/kg também foi capaz de reduzir o número de leucócitos migrados (Figura 14B). Contudo, quando anlodipina foi administrada na

dose de 3 mg/kg a SHR não foi observada diferença na migração leucocitária comparada ao veículo (Figura 14C). Já a redução da dose de hidralazina para ~ 3,5 mg/kg ainda foi capaz de causar diminuição do número de leucócitos migrados para o interstício, através de vênulas da fáscia espermática de SHR, comparado ao grupo controle (Figura 14D).

Semelhante ao observado em SHR, tanto o diclofenaco de potássio quanto a anlodipina 10 mg/kg foram capazes de reduzir o número de leucócitos migrados para o interstício em área correspondente a 2500 μm^2 de extensão, próxima a vênulas da fáscia espermática de ratos Wistar, 2 h após estímulo local com $\text{TNF-}\alpha$. Contudo, tal redução não foi observada no grupo em que foram administrados o antiinflamatório e o anti-hipertensivo combinados (Figura 15A). O tratamento de ratos Wistar com hidralazina ~ 14 mg/kg também foi capaz de reduzir o número de leucócitos migrados (Figura 15B) ao contrário do que foi observado na dose de ~ 3,5 mg/kg, que não reduziu a migração leucocitária (Figura 15C).

Figura 14: Migração leucocitária determinada em 2500 μm^2 de área próxima a vênulas (14 a 18 μm de diâmetro) da fáscia espermática de SHR machos 2 h após injeção local de $\text{TNF-}\alpha$ (5 ng/0,1 mL). Os ratos foram submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo (□), diclofenaco de potássio 1 mg/kg (▤), anlodipina 10 mg/kg (▥) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg (▧), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo (□) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (■), na água de beber, durante 15 dias; **C)** veículo (□) ou anlodipina 3 mg/kg (▤), por via oral, durante o período de 15 dias; **D)** veículo (□) ou hidralazina ~ 3,5 mg/kg (■), na água de beber, durante 15 dias. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs grupo tratado com veículo; # $P < 0,05$ vs grupo tratado com diclofenaco.

Figura 15: Migração leucocitária determinada em 2500 μm^2 de área próxima a vênulas (14 a 18 μm de diâmetro) da fáscia espermática de ratos Wistar machos 2 h após injeção local de $\text{TNF-}\alpha$ (5 ng/0,1 mL). Os ratos foram submetidos aos seguintes tratamentos: **A)** veículo (□), diclofenaco de potássio 1 mg/kg (▤), anlodipina 10 mg/kg (▥) ou diclofenaco de potássio 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg (▧), por via oral, durante o período de 15 dias; **B)** veículo (□) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (■), na água de beber, durante 15 dias. **C)** veículo (□) ou hidralazina ~ 3,5 mg/kg (▨), na água de beber, durante 15 dias. O número de animais testados por grupo está indicado no interior de cada barra.
* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs grupo tratado com veículo; # $P < 0,05$ vs grupo tratado com diclofenaco.

3.9 Velocidade do Fluxo Sanguíneo e Taxa de Atrito Venular (“Shear Rate”)

O tratamento dos SHR com diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg ou a associação de ambos não alterou a velocidade do fluxo sanguíneo, bem como a taxa de atrito, de vênulas de segunda ordem (14-18 μm) da fáscia espermática, comparado ao grupo tratado apenas com o veículo (Tabela 5). A administração de hidralazina ~ 14 mg/kg também não alterou esses parâmetros (Tabela 6).

Do mesmo modo, o tratamento de ratos Wistar com diclofenaco, anlodipina ou a associação desses fármacos não influenciou a velocidade do fluxo sanguíneo ou a taxa de atrito de vênulas de segunda ordem (14-18 μm) da fáscia espermática (Tabela 5), semelhante ao observado com hidralazina ~ 14 mg/kg, que também não alterou tais parâmetros (Tabela 6).

Tabela 5 – Velocidade do fluxo sanguíneo e taxa de atrito de vênulas de segunda ordem (14-18 μm) da fáscia espermática de SHR e ratos Wistar submetidos aos seguintes tratamentos: veículo, diclofenaco 1 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg ou diclofenaco 1 mg/kg combinado à anlodipina 10 mg/kg, por via oral, durante o período de 15 dias.

Grupos	Velocidade do fluxo sanguíneo ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$)	Taxa de atrito venular (s^{-1})
SHR		
Veículo ^a	2,15 $\pm$ 0,11 (08)	1011 $\pm$ 52 (07)
Diclofenaco 1 mg/kg ^a	2,51 $\pm$ 0,10 (09)	1152 $\pm$ 40 (09)
Anlodipina 10 mg/kg ^a	2,24 $\pm$ 0,10 (08)	1004 $\pm$ 43 (07)
Diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg ^a	2,37 $\pm$ 0,07 (06)	1119 $\pm$ 40 (06)
Wistar		
Veículo ^a	1,95 $\pm$ 0,06 (06)	935 $\pm$ 52 (07)
Diclofenaco 1 mg/kg ^a	2,16 $\pm$ 0,17 (06)	1024 $\pm$ 63 (06)
Anlodipina 10 mg/kg ^a	2,09 $\pm$ 0,06 (07)	1002 $\pm$ 35 (07)
Diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg ^a	2,13 $\pm$ 0,09 (05)	941 $\pm$ 56 (05)

a = Resultados apresentados como média $\pm$ epm; o número de animais testados por grupo está entre parênteses.

Tabela 6 – Velocidade do fluxo sanguíneo e taxa de atrito de vênulas de segunda ordem (14-18 μm) da fáscia espermática de SHR e ratos Wistar submetidos aos seguintes tratamentos: veículo ou hidralazina ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante 15 dias.

Grupos	Velocidade do fluxo sanguíneo ($\text{mm} \cdot \text{s}^{-1}$)	Taxa de atrito venular (s^{-1})
SHR		
Veículo ^a	2,15 $\pm$ 0,11 (08)	1011 $\pm$ 52 (07)
Hidralazina ~ 14 mg/kg ^a	2,25 $\pm$ 0,07 (08)	1020 $\pm$ 29 (08)
Wistar		
Veículo ^a	1,95 $\pm$ 0,06 (06)	935 $\pm$ 52 (07)
Hidralazina ~ 14 mg/kg ^a	2,06 $\pm$ 0,04 (07)	953 $\pm$ 42 (07)

a = Resultados apresentados como média $\pm$ epm; o número de animais testados por grupo está entre parênteses.

3.10 Leucogramas Total e Diferencial

Os tratamentos dos SHR durante 15 dias com diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg ou diclofenaco associado à anlodipina 10 mg/kg não modificou nem o número de leucócitos total nem o diferencial quando comparados aos ratos tratados com veículo (Tabela 7). O mesmo foi observado quando os SHR foram tratados com hidralazina ~ 14 mg/kg (Tabela 8).

Os tratamentos com diclofenaco ou anlodipina, associados ou não, não alteraram o número de leucócitos total ou diferencial em ratos Wistar, em relação ao tratamento com veículo (Tabela 7). A administração de hidralazina ~ 14 mg/kg também não influenciou o número de leucócitos total ou diferencial nesses ratos (Tabela 8).

Tabela 7 – Número de leucócitos total e diferencial (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos) coletados da cauda de SHR e ratos Wistar não anestesiados submetidos aos seguintes tratamentos: veículo, diclofenaco 1 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg ou diclofenaco 1mg/kg combinado à anlodipina 10 mg/kg, por via oral, durante o período de 15 dias.

Grupos Leucócitos	Veículo	Diclofenaco 1 mg/kg	Anlodipina 10 mg/kg	Diclofenaco+ Anlodipina
SHR				
Total ^a	7892±723 (10)	8267±618 (12)	7150±360 (09)	6172±452 (09)
Linfócitos ^a	4977±659 (07)	5313±548 (12)	4726±340 (09)	3982±286 (09)
Neutrófilos ^a	1640±188 (07)	1932±191 (11)	1984±204 (09)	1993±315 (08)
Eosinófilos ^a	53,3±29,5 (07)	50,9±20,3 (12)	24,4±16,3 (09)	16,7±16,7 (09)
Monócitos ^a	301±91 (07)	341±50 (10)	391±81 (08)	302±37 (09)
Wistar				
Total ^a	9584±640 (10)	8929±584 (12)	7687±995 (09)	9595±913 (10)
Linfócitos ^a	7153±359 (10)	6555±263 (12)	5802±227 (06)	6304±388 (08)
Neutrófilos ^a	1905±241 (12)	1618±300 (12)	1356±310 (10)	1668±281 (10)
Eosinófilos ^a	33,7±33,7 (11)	40,1±22,7 (10)	58,3±32,9 (09)	27,8±14,2 (09)
Monócitos ^a	642±126 (12)	642±100 (12)	409±86 (08)	646±197 (08)

a = Resultados apresentados como média ± epm; o número de animais testados por grupo está entre parênteses.

Tabela 8 – Número de leucócitos total e diferencial (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos) coletados da cauda de SHR e ratos Wistar não anestesiados submetidos aos seguintes tratamentos: veículo ou hidralazina ~ 14 mg/kg, na água de beber, durante 15 dias.

Grupos Leucócitos	Veículo	Hidralazina ~ 14 mg/kg
SHR		
Total ^a	7892±723 (10)	7673±444 (11)
Linfócitos ^a	5586±499 (10)	5885±459 (11)
Neutrófilos ^a	1742±130 (12)	1560±110 (11)
Eosinófilos ^a	62±18 (12)	30±13 (11)
Monócitos ^a	198±91 (12)	199±86 (11)
Wistar		
Total ^a	9584±640 (10)	11540±443 (05)
Linfócitos ^a	7153±359 (10)	8686±768 (05)
Neutrófilos ^a	1905±241 (12)	1985±228 (08)
Eosinófilos ^a	34±34 (11)	72±28 (08)
Monócitos ^a	557±88 (12)	560±186 (08)

a = Resultados apresentados como média ± epm; o número de animais testados por grupo está entre parênteses.

3.11 Concentrações Plasmáticas de Diclofenaco e Anlodipina

A concentração plasmática de diclofenaco administrado por via oral a SHR não foi modificada quando se associou anlodipina 10 mg/kg (Figuras 16A e 16B). Da mesma forma, os níveis plasmáticos de anlodipina 10 mg/kg administrado por via oral não foram alterados quando se administrou conjuntamente diclofenaco a SHR (Figuras 17A e 17B).

Semelhante ao observado em SHR, as concentrações plasmáticas de diclofenaco administrado por via oral associado ou não à anlodipina 10 mg/kg foram

similares (Figuras 18A e 18B), bem como a concentração plasmática de anlodipina 10 mg/kg quando foi administrada combinada ou não ao diclofenaco (Figuras 19A e 19B).

Figura 16: Curvas de concentração plasmática (A) e área sob a curva – AUC – (B) de diclofenaco de potássio (1 mg/kg) quando administrado sozinho ou associado à anlodipina (10 mg/kg), por via oral, a SHR. O número de animais testados por grupo (n) está indicado no interior de cada barra.

Figura 17: Curvas de concentração plasmática (A) e área sob a curva – AUC – (B) de anlodipina (10 mg/kg) quando administrada sozinha ou associada ao diclofenaco (1 mg/kg), por via oral, a SHR. O número de animais testados por grupo (n) está indicado no interior de cada barra.

Figura 18: Curvas de concentração plasmática (A) e área sob a curva – AUC – (B) de diclofenaco (1 mg/kg) quando administrado sozinho ou associado à anlodipina (10 mg/kg), por via oral, a ratos Wistar. O número de animais testados por grupo (n) está indicado no interior de cada barra.

Figura 19: Curvas de concentração plasmática (A) e área sob a curva – AUC – (B) de anlodipina (10 mg/kg) quando administrada sozinha ou associada ao diclofenaco (1 mg/kg), por via oral, a ratos Wistar. O número de animais testados por grupo (n) está indicado no interior de cada barra.

3.12 Imunohistoquímica para determinação da concentração protéica de ICAM-1, PECAM-1 e P-selectina

Tanto a administração de diclofenaco quanto a de anlodipina 10 mg/kg foram capazes de reduzir a expressão de ICAM-1 em vênulas de SHR. Contudo, quando esses fármacos foram administrados em combinação a redução da expressão de ICAM-1 não foi mais observada (Figuras 20A e 20C).

O tratamento de SHR com hidralazina ~ 14 mg/kg também reduziu a expressão de ICAM-1 venular (Figuras 20B e 20C). Por outro lado, nenhum dos

tratamentos alterou as expressões de PECAM-1 (Figuras 21A, 21B e 21C) e P-selectina (Figuras 22A, 22B e 22C) nas vênulas de SHR.

A administração de diclofenaco a ratos Wistar não alterou a expressão de ICAM-1 venular. Contudo, quando esses ratos foram tratados com anlodipina 10 mg/kg, observamos redução da expressão de ICAM-1 em vênulas. Tal redução não foi mais observada quando diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg foram associados. Hidralazina ~ 14 mg/kg não alterou a expressão de ICAM-1 em vênulas de ratos Wistar (Figuras 23A, 23B e 23C).

Diclofenaco administrado a ratos Wistar também não alterou a expressão de PECAM-1 em vênulas. No entanto, o tratamento desses ratos com anlodipina 10 mg/kg reduziu a expressão dessa molécula de aderência, efeito esse que foi perdido quando anlodipina foi administrada junto com diclofenaco. Hidralazina ~ 14 mg/kg não alterou a expressão de PECAM-1 em vênulas de ratos Wistar (Figuras 24A, 24B e 24C). Por sua vez, nenhum dos tratamentos alterou a expressão de P-selectina em vênulas de ratos Wistar, exceto hidralazina ~ 14 mg/kg, que reduziu a expressão dessa molécula (Figuras 25A, 25B e 25C).

Figura 20: **A)** Expressão protéica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de imunohistoquímica exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). As imagens foram capturadas e os resultados foram obtidos utilizando-se o programa KS 300. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs CN; ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ vs V. Os valores representam a média $\pm$ epm. **C)** Microfotografias representativas da intensidade de marcação de ICAM-1 em cada grupo. Barra igual a 40 μ m.

Figura 21: **A)** Expressão protéica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de imunohistoquímica exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). As imagens foram capturadas e os resultados foram obtidos utilizando-se o programa KS 300. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs CN. Os valores representam a média $\pm$ epm. **C)** Microfotografias representativas da intensidade de marcação de PECAM-1 em cada grupo. Barra igual a 40 μ m.

Figura 22: **A)** Expressão protéica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em vênulas de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de imunohistoquímica exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em vênulas de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). As imagens foram capturadas e os resultados foram obtidos utilizando-se o programa KS 300. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs CN. Os valores representam a média ± epm. **C)** Microfotografias representativas da intensidade de marcação de P-selectina em cada grupo. Barra igual a 40 µm.

Figura 23: **A)** Expressão protéica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de imunohistoquímica exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). As imagens foram capturadas e os resultados foram obtidos utilizando-se o programa KS 300. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs CN; # $P < 0,05$ vs V. Os valores representam a média $\pm$ epm. **C)** Microfotografias representativas da intensidade de marcação de ICAM-1 em cada grupo. Barra igual a 40 μ m.

Figura 24: **A)** Expressão protéica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de imunohistoquímica exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em vênulas de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). As imagens foram capturadas e os resultados foram obtidos utilizando-se o programa KS 300. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs CN; # $P < 0,05$ vs V. Os valores representam a média $\pm$ epm. **C)** Microfotografias representativas da intensidade de marcação de PECAM-1 em cada grupo. Barra igual a 40 µm.

Figura 25: **A)** Expressão protéica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em vênulas de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de imunohistoquímica exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em vênulas de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). As imagens foram capturadas e os resultados foram obtidos utilizando-se o programa KS 300. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs CN; ## $P < 0,01$ vs V. Os valores representam a média $\pm$ epm. **C)** Microfotografias representativas da intensidade de marcação de P-selectina em cada grupo. Barra igual a 40 μ m.

3.13 RT-PCR para Determinação da Expressão Gênica ICAM-1, PECAM-1 e P-selectina

SHR tratados tanto com diclofenaco como com anlodipina 10 mg/kg tiveram a expressão gênica de ICAM-1 reduzida quando comparados aos ratos tratados com veículo. Contudo, quando esses fármacos foram administrados combinados, tal redução não foi mais observada. Hidralazina ~ 14 mg/kg também reduziu a expressão gênica de ICAM-1 em SHR (Figura 26). Por outro lado, nenhum tratamento alterou a expressão gênica de PECAM-1 (Figura 27) e P-selectina (Figura 28) nesses ratos.

Nenhum dos tratamentos empregados alterou a expressão gênica de ICAM-1 (Figura 29) e PECAM-1 (Figura 30) em ratos Wistar. Do mesmo modo, diclofenaco associado ou não à anlodipina 10 mg/kg bem como anlodipina 10 mg/kg isoladamente administrada, não alterou a expressão gênica de P-selectina em ratos Wistar, diferente do observado após administração de hidralazina ~ 14 mg/kg, que reduziu a expressão dessa CAM (Figura 31).

Figura 26: **A)** Expressão gênica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em fâscia espermática de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **B)** Expressão gênica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em fâscia espermática de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). O cDNA sintetizado a partir do mRNA da β -actina foi utilizado para normalização. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ vs V. Os valores representam a média $\pm$ epm.

Figura 27: **A)** Expressão gênica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **B)** Expressão gênica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). O cDNA sintetizado a partir do mRNA da β -actina foi utilizado para normalização. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. Os valores representam a média $\pm$ epm.

Figura 28: **A)** Expressão gênica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **B)** Expressão gênica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). O cDNA sintetizado a partir do mRNA da β -actina foi utilizado para normalização. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. Os valores representam a média $\pm$ epm.

Figura 29: **A)** Expressão gênica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **B)** Expressão gênica de ICAM-1, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). O cDNA sintetizado a partir do mRNA da β -actina foi utilizado para normalização. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. Os valores representam a média $\pm$ epm.

Figura 30: **A)** Expressão gênica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **B)** Expressão gênica de PECAM-1, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). O cDNA sintetizado a partir do mRNA da β -actina foi utilizado para normalização. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. Os valores representam a média $\pm$ epm.

Figura 31: **A)** Expressão gênica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **B)** Expressão gênica de P-selectina, em unidades arbitrárias, em fásia espermática de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). O cDNA sintetizado a partir do mRNA da β -actina foi utilizado para normalização. O número dentro das barras refere-se ao número de ratos utilizados. * $P < 0,05$ vs V. Os valores representam a média $\pm$ epm.

3.14 Citometria de Fluxo para Determinação da Concentração Protéica de CD18 e L-selectina

A administração de diclofenaco e anlodipina 10 mg/kg, associados ou não, bem como de hidralazina ~ 14 mg/kg a SHR (Figura 32) ou ratos Wistar (Figura 33) não alterou a expressão protéica de CD18 em granulócitos. Do mesmo modo, diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg, a combinação de ambos ou hidralazina ~ 14 mg/kg não interferiram na expressão de L-selectina em granulócitos de SHR (Figura 34). Contudo, em ratos Wistar, a administração de hidralazina ~ 14 mg/kg, mas não de diclofenaco, anlodipina 10 mg/kg ou a combinação desses dois últimos, aumentou a expressão de L-selectina nos granulócitos (Figura 35).

Figura 32: **A)** Expressão protéica de CD18, em intensidade de fluorescência, em granulócitos de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de citometria de fluxo exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de CD18, em unidades arbitrárias, em granulócitos de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). A população de granulócitos foi separada em uma janela, contendo cerca de 5000 eventos, e analisada utilizando o “software” Cell Quest (Becton-Dickinson). “n” representa o número de ratos utilizados. Os valores representam a média $\pm$ epm. **C)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **D)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (H).

Figura 33: **A)** Expressão protéica de CD18, em intensidade de fluorescência, em granulócitos de ratos Wistar não estimulados após tratamento após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de citometria de fluxo exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de CD18, em unidades arbitrárias, em granulócitos de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). A população de granulócitos foi separada em uma janela, contendo cerca de 5000 eventos, e analisada utilizando o “software” Cell Quest (Becton-Dickinson). “n” representa o número de ratos utilizados. Os valores representam a média ± epm. **C)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **D)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (H).

Figura 34: **A)** Expressão protéica de L-selectina, em intensidade de fluorescência, em granulócitos de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de citometria de fluxo exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de L-selectina, em unidades arbitrárias, em granulócitos de SHR não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). A população de granulócitos foi separada em uma janela, contendo cerca de 5000 eventos, e analisada utilizando o “software” Cell Quest (Becton-Dickinson). “n” representa o número de ratos utilizados. Os valores representam a média $\pm$ epm. **C)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **D)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (H).

Figura 35: **A)** Expressão protéica de L-selectina, em intensidade de fluorescência, em granulócitos de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). O controle negativo (CN) foi submetido a todos os passos inerentes à técnica de citometria de fluxo exceto a incubação com o anticorpo primário. **B)** Expressão protéica de L-selectina, em unidades arbitrárias, em granulócitos de ratos Wistar não estimulados após tratamento com veículo (V) ou com hidralazina ~ 14 mg/kg (H). A população de granulócitos foi separada em uma janela, contendo cerca de 5000 eventos, e analisada utilizando o “software” Cell Quest (Becton-Dickinson). “n” representa o número de ratos utilizados. Os valores representam a média $\pm$ epm. * $P < 0,05$ vs. V. **C)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V), diclofenaco 1 mg/kg (D), anlodipina 10 mg/kg (A) ou diclofenaco 1 mg/kg + anlodipina 10 mg/kg (D + A). **D)** Representação espectral do número de eventos pela intensidade de fluorescência após administração de veículo (V) ou hidralazina ~ 14 mg/kg (H).

Quadro 1 – Efeito dos tratamentos com diclofenaco 1 mg/kg, anlodipina 10 mg/kg ou diclofenaco 1 mg/kg associado à anlodipina 10 mg/kg, comparado ao respectivo veículo, sobre a expressão protéica de moléculas de aderência celular em SHR e ratos Wistar.

Grupos CAMs	Veículo	Diclofenaco 1 mg/kg	Anlodipina 10 mg/kg	Diclofenaco+ Anlodipina
SHR				
ICAM-1	↑↓	↓	↓	↑↓
PECAM-1	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
P-selectina	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
CD18	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
L-selectina	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
Wistar				
ICAM-1	↑↓	↑↓	↓	↑↓
PECAM-1	↑↓	↑↓	↓	↑↓
P-selectina	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
CD18	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓
L-selectina	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓

↑↓ - não altera; ↓ - diminui;
CAMs = moléculas de aderência celular.

Quadro 2 – Efeito do tratamento com hidralazina ~ 14 mg/kg, comparado ao respectivo veículo, sobre a expressão protéica de moléculas de aderência celular em SHR e ratos Wistar.

Grupos CAMs	Veículo	Hidralazina ~ 14 mg/kg
SHR		
ICAM-1	↑↓	↓
PECAM-1	↑↓	↑↓
P-selectina	↑↓	↑↓
CD18	↑↓	↑↓
L-selectina	↑↓	↑↓
Wistar		
ICAM-1	↑↓	↑↓
PECAM-1	↑↓	↑↓
P-selectina	↑↓	↓
CD18	↑↓	↑↓
L-selectina	↑↓	↑

↑↓ - não altera; ↓ - diminui; ↑ - aumenta;
CAMs = moléculas de aderência celular.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstramos que a anlodipina reduz o efeito do diclofenaco sobre o comportamento leucocitário tanto em SHR como em ratos Wistar, normotensos, mas aparentemente por mecanismos distintos. Em SHR, mas não em ratos Wistar, observamos que a anlodipina prejudica a redução da expressão de ICAM-1 em células endoteliais causada pelo diclofenaco, dessa forma interferindo na diminuição da aderência e migração leucocitárias. O mecanismo da interação em ratos Wistar permanece desconhecido, e não envolve efeito sobre parâmetros hemodinâmicos, no caso velocidade do fluxo sanguíneo e taxa de atrito venulares, número de leucócitos circulantes, as moléculas de aderência ICAM-1, PECAM-1, CD11/CD18, L-selectina e P-selectina ou interação farmacocinética.

Estudos indicam que proporção significativa de pessoas que tem HA utiliza AINEs regularmente (JOHNSON et al., 1994; JOHNSON, 1998). Em idosos, foi demonstrado que o percentual de indivíduos que fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos e antiinflamatórios concomitantemente pode alcançar 12 a 15% (JOHNSON, 1998).

Interação medicamentosa entre anti-hipertensivos e antiinflamatórios tem sido observada. Essa interação pode ocorrer tanto por ação do antiinflamatório interferindo no efeito redutor da PA causado pelo agente anti-hipertensivo (JOHNSON et al. 1994; POPE et al., 1993) como por ação do anti-hipertensivo se contrapondo ao efeito antiinflamatório de AINEs (MARTINEZ et al., 2004, 2005).

ANLODIPINA NA PRESSÃO ARTERIAL

A anlodipina pertence à classe das diidropiridinas, agentes anti-hipertensivos antagonistas dos canais de cálcio do tipo L, que sofre absorção lenta e exerce efeito farmacológico prolongado. A anlodipina produz vasodilatação arterial periférica e dilatação coronariana, com a vantagem de promover menos taquicardia reflexa, possivelmente pelo fato de a meia-vida longa produzir picos e depressões mínimos desse fármaco no plasma (LEHMANN et al., 1993; VAN ZWIETEN e PFAFFENFORD, 1993; TAYLOR, 1994).

Acompanhamento do efeito da anlodipina sobre os níveis de PA em SHR, em nosso estudo, permitiu-nos concluir que o tratamento foi eficaz pois houve redução considerável desse parâmetro já após 24 h do início da administração, na dose de

10 mg/kg, efeito também observado ao final de 15 dias de tratamento. Permitiu-nos ainda concluir que o efeito é dependente de dose, pois na dose de 3 mg/kg, não foi observado efeito desse agente sobre a PA. Semelhante a esse resultado, Yokota et al. (1998) demonstraram redução da PA em SHR machos tratados com anlodipina na mesma dose (10 mg/kg) utilizada no presente estudo.

Em ratos Wistar não foi observado efeito da anlodipina sobre a PA, o que pode ser decorrente de mecanismos reguladores compensatórios funcionalmente mais eficazes, próprios de ratos normotensos quando comparado a hipertensos, que antagonizam a vasodilatação arterial periférica pela ativação, por exemplo, dos barorreceptores, com posterior estímulo vasoconstritor simpático (PRADOS et al., 1998).

DICLOFENACO NA PRESSÃO ARTERIAL

AINEs, classe de fármacos na qual o diclofenaco está inserido, têm sido utilizados eficazmente há várias décadas no tratamento sintomático de doenças inflamatórias agudas ou crônicas. Esses fármacos atuam principalmente pela inibição da síntese de PGs, o que explica tanto algumas de suas ações farmacológicas (antipirética, analgésica e anti-agregante plaquetária) quanto efeitos colaterais como disfunção gástrica e/ou renal. O acompanhamento do peso corpóreo e a análise macroscópica do estômago tanto dos SHR quanto dos ratos Wistar tratados durante 15 dias com diclofenaco de potássio, associado ou não à anlodipina, permitiram descartar a possibilidade de efeito gástrico lesivo, principalmente provocado pelo diclofenaco de potássio, visto que não houve diferença entre esses tratamentos e o respectivo grupo tratado com veículo.

Dentre os efeitos renais da utilização dos AINEs tem sido observada redução da taxa de filtração glomerular e retenção de líquido, com conseqüente aumento da PA (WHELTON, 2000) entretanto, foi demonstrado que efeitos colaterais renais geralmente ocorrem numa fração pequena de pacientes tratados com AINEs de maneira dependente da dose (WHELTON, 1999). Tais efeitos podem ser devidos em grande parte à inibição da síntese de PGs renais causada pelos AINEs, causando aumento do tônus vascular e retenção de sódio e água, uma vez que PGI_2 e PGE_2 estão envolvidos em processos vasodilatadores no leito vascular renal (DUNN e HOOD, 1977) e na excreção de sódio e água (RUOFF, 1998). Apesar disso, observamos que o tratamento dos ratos - SHR e Wistar - por 15 dias com o

antiinflamatório diclofenaco de potássio não alterou a PA nem o peso corpóreo quando comparado ao respectivo grupo que recebeu veículo. Dessa forma, o diclofenaco na dose de 1 mg/kg, administrado isoladamente ou associado à anlodipina, parece não ser capaz de causar efeitos colaterais renais tanto em SHR como em ratos Wistar.

A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

A migração de leucócitos do sistema vascular para áreas de exposição a patógenos é evento chave no processo da inflamação. A reação inflamatória torna o organismo capaz de se defender contra microrganismos infecciosos, podendo também causar efeitos deletérios se os mecanismos reguladores da resposta inflamatória estão alterados ou respostas imunes a produtos microbianos residuais ou a componentes teciduais provocam uma resposta inflamatória persistente. Em tais circunstâncias, a defesa dos leucócitos pode se transformar em ataque contra o próprio organismo, podendo levar à destruição tecidual (WEISS, 1989).

A entrada dos leucócitos no sítio de lesão ou infecção se faz por mecanismos moleculares que tornam os leucócitos capazes de reconhecer tais sítios, ainda dentro dos vasos, estabelecerem contato com o endotélio e migrarem através da parede do vaso sanguíneo. O reconhecimento, assim como o contato, é mediado por várias CAMs que atuam de maneira seqüencial, em conjunto com mediadores regulatórios, tais como, quimiocinas. As CAMs que estão envolvidas nesse processo pertencem a três famílias: selectinas, integrinas e moléculas com domínios semelhantes a imunoglobulinas (KRIEGLSTEIN e GRANGER, 2001). As selectinas – L-, E- e P-selectina – medeiam o início do contato entre leucócitos e células endoteliais (BOSSE e VESTWEBER, 1994; LEWINSOHN et al., 1987; LEY, 2001; MULLIGAN et al., 1991). Esse acoplamento, mediado por selectinas, em combinação com o fluxo sanguíneo rápido, leva ao movimento de rolar dos leucócitos sobre a superfície das células endoteliais, explicado por uma frequência extremamente rápida de formação e quebra da ligação das selectinas com seus ligantes. Em contraste com os leucócitos que se movimentam rapidamente presentes na região central do fluxo sanguíneo, os “rollers” captam sinais do endotélio, que os estimulam a aderir mais firmemente à superfície da célula endotelial. Tais sinais podem ser dados por quimiocinas, como a CC-quimiocina ligante-5 (CCL5, previamente conhecida como RANTES) ou a CXC-quimiocina

ligante-4 (CXCL4), que estão presentes e imobilizados por proteoglicanas no endotélio, ou por outros mediadores tais como o fosfolípido fator ativador plaquetário (PAF). A aderência leucocitária ocorre após ligação de integrinas leucocitárias a membros da superfamília de imunoglobulinas, dentre as quais ICAM-1 e VCAM-1, expressas em células endoteliais (CAMPBELL et al., 1996, 1998). As integrinas mais relevantes para a aderência leucocitária pertencem às subfamílias $\beta 1$ integrina e $\beta 2$ integrina, das quais as mais estudadas são a $\alpha 4\beta 1$ integrina e a $\alpha L\beta 2$ integrina (também conhecida como LFA1, antígeno 1 associado à função linfocitária).

A migração através da parede venular é o passo final do processo de emigração leucocitária em direção a tecidos inflamados e pode ocorrer com mínimo prejuízo à complexa estrutura da parede vascular. Antes de atravessar a parede das vênulas pós-capilares neutrófilos realizam o recém-descrito processo denominado “crawling” caracterizado pelo movimento de rastejar dos leucócitos pela parede dos vasos sanguíneos em processo dependente de ICAM-1 e $\alpha M\beta 2$ -integrina (também conhecida como Mac-1, receptor 1 de macrófago) em busca de melhores sítios para migração (PHILLIPSON et al., 2006; SCHENKEL et al., 2004). Leucócitos encontram três diferentes barreiras durante o processo de migração leucocitária: células endoteliais, a membrana basal da célula endotelial e os pericitos, que são células que envolvem as células endoteliais de quase todas as vênulas pós-capilares. Assim como a aderência, a migração transendotelial pode ser desencadeada por agentes quimioatrativos luminiais que atuam em conjunto com o “shear flow”. A migração de leucócitos pelas células endoteliais pode ocorrer por duas vias distintas: paracelular e transcelular. A via paracelular é caracterizada pela migração dos leucócitos através da abertura dos contatos entre células endoteliais via ativação da quinase de cadeia leve de miosina e subsequente contração das células endoteliais (HUANG et al., 1993; MULLER, 2003). Moléculas membros da superfamília de imunoglobulinas como a PECAM-1, ICAM-1 e ICAM-2 expressas em células endoteliais participam ativamente desse tipo de migração leucocitária. Enquanto ICAM-1 e ICAM-2 interagem com a $\alpha L\beta 2$ integrina leucocitária, ligação homofílica de PECAM-1 presente tanto em leucócitos como em células endoteliais é observada. O número de leucócitos que migram via transcelular parece ser bem menor do que aqueles que o fazem via paracelular (~ 5-20% dos leucócitos migrados após estímulo de HUVECs

com citocinas) (CARMAN e SPRINGER, 2004). A migração transcelular ocorre após a formação de canais nas células endoteliais através dos quais os leucócitos podem passar, sendo importante a presença de moléculas como ICAM-1 e PECAM-1 para a ocorrência desse processo (CINAMON et al., 2004; MAMDOUH et al., 2003; MILLAN et al., 2006). Finalmente, os leucócitos movem-se em direção à membrana basal endotelial e pericitos, atravessando-os em regiões com baixa deposição de proteínas de matriz, como laminina-10 e colágeno IV, e “gaps” entre pericitos. Moléculas como $\alpha 6 \beta 1$ integrina e elastase neutrofílica são importantes nessa etapa (ADAIR-KIRK et al., 2003; CEPINSKAS et al., 1999; DANGERFIELD et al., 2002).

ANLODIPINA E A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Antagonistas dos canais de cálcio podem, além de reduzir a PA, diminuir a progressão da aterosclerose (HENRY e BENTLEY, 1981; LICHTLEN et al., 1990), a produção de radicais livres (VAN AMSTERDAM et al., 1992) e a expressão de CAMs em células endoteliais (COMINACINI et al., 1997, 1999; HALLER et al., 1995; NEBE et al., 2002; YOSHII et al., 2006). Portanto, diminuindo a expressão de CAMs, antagonistas dos canais de cálcio poderiam reduzir o comportamento leucocitário. Não observamos, entretanto, efeito da anlodipina, isoladamente administrada, sobre o rolamento leucocitário em SHR e ratos Wistar. Isso pode ser explicado pelo fato da anlodipina não ter alterado a expressão de P- e L-selectinas tanto em SHR como em ratos Wistar. É possível que o aumento da dose de anlodipina possa reduzir tanto o rolamento leucocitário como a expressão de selectinas. De fato, Cominacini et al. (1999) demonstraram que a ação da anlodipina sobre a expressão de CAMs é um processo dependente da dose, pois somente a dose mais elevada por ele utilizada foi capaz de reduzir a expressão de E-selectina, molécula que participa da etapa do rolamento leucocitário em cultura de células endoteliais. Portanto, o aumento da dose de anlodipina talvez possa precipitar algum efeito sobre o rolamento leucocitário e sobre a expressão de L- e/ou P-selectina(s).

Um dos mecanismos mais prováveis pelo qual a anlodipina possa estar reduzindo a aderência e/ou a migração leucocitárias pode envolver a diminuição da expressão de CAMs tanto em SHR quanto em ratos Wistar. De fato, nós demonstramos que anlodipina reduz a expressão de ICAM-1 em células endoteliais venulares de SHR, e de ICAM-1 e PECAM-1 em células endoteliais venulares de ratos Wistar. Resultado semelhante foi observado por Toba et al. (2005) em modelo

de hipertensão induzida por N^G -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME). Esses autores demonstraram que a anlodipina (20 mg/kg/dia) é capaz de reduzir a expressão de ICAM-1, VCAM-1, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, e proteína quimiotática para monócitos-1 (MCP-1), moléculas relacionadas ao processo inflamatório, em aorta, independentemente da redução da PA. No presente estudo, no entanto, a redução da PA causada pela anlodipina em SHR não pode ser separada de seus efeitos reduzindo aderência e migração leucocitárias, visto que quando reduzimos a dose de anlodipina de modo a não mais reduzir a PA, também não observamos redução da aderência e migração. Portanto, ao que parece, dependendo do modelo de HA utilizado, a redução da PA parece ser importante para controlar certos aspectos do processo inflamatório.

O NF- κ B é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes, dentre eles, vários envolvidos nas respostas imunológica e inflamatória (KOPP e GHOSH, 1995, KALLWELLIS et al., 2006). Ele não é o único fator de transcrição envolvido na regulação desses genes e freqüentemente atua associado a outros fatores como o AP-1 e o fator nuclear de IL-6 (NF-IL-6). O NF- κ B é ativado por muitos fatores que promovem respostas inflamatórias, incluindo infecções virais, agentes oxidantes e antígenos. Essa ativação leva à expressão coordenada de uma série de genes que codificam proteínas (como citocinas, quimiocinas, CAMs e enzimas) envolvidas na síntese de mediadores e amplificação e perpetuação da resposta inflamatória.

O mecanismo pelo qual o TNF- α aumenta aderência e migração leucocitárias envolve a ativação do NF- κ B, via atividade da NADPH oxidase, resultando no aumento da expressão de CAMs, dentre elas, ICAM-1 (COLLINS et al., 1995; THAM et al., 2002; VOGEL et al., 2006). Dessa forma, o NF- κ B pode ser um alvo óbvio de ação de agentes farmacológicos com propriedades antiinflamatórias. De fato, tem-se demonstrado que a anlodipina (MATSUMORI et al., 2000; SIRAGY et al., 2006), reduz a expressão do NF- κ B. Além disso, propriedades anti-oxidantes desse fármaco também poderiam contribuir para a redução da atividade do NF- κ B. Yoshii et al. (2006) demonstraram que a anlodipina é capaz de reduzir a expressão e atividade da NADPH oxidase e em paralelo a expressão de ICAM-1 em camundongos nocaute para apolipoproteína E (ApoEKO). Portanto, podemos propor

que a anlodipina reduz a expressão protéica e gênica de ICAM-1 em SHR, e a expressão protéica de ICAM-1 e PECAM-1 em ratos Wistar, observadas no presente estudo, por reduzir diretamente a atividade do NF- κ B ou indiretamente, reduzindo a atividade da NADPH oxidase. Em ratos Wistar, não observamos redução da expressão gênica de ICAM-1 e PECAM-1 após tratamento com anlodipina, sugerindo que mecanismos de controle pós-transcripcionais da expressão dessas moléculas podem estar sendo negativamente regulados pela anlodipina nesses ratos, de tal sorte a observarmos redução de sua expressão protéica.

Os efeitos da anlodipina reduzindo aderência e migração leucocitárias em SHR e apenas a migração em ratos Wistar, não podem ser atribuídos à ação desse fármaco interferindo no número e velocidade dos leucócitos circulantes, velocidade do fluxo sanguíneo e taxa de atrito venulares, pois não houve diferença nesses parâmetros entre ratos tratados com o anti-hipertensivo ou o veículo.

DICLOFENACO E A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Sabe-se que o diclofenaco de potássio reduz a expressão de várias CAMs e, portanto, a interação entre leucócitos e endotélio. Diclofenaco reduz inflamação, edema e dor proveniente de artrite por inibir a produção de PGs (BROOKS et al., 1980; SKOUTAKIS et al., 1988; TODD e SORCKIN, 1988), interfere com a função de leucócitos polimorfonucleares *in vitro*, reduzindo a quimiotaxia, geração de radicais superóxido e produção de proteases neutras (FRIMAN et al., 1986), e também reduz a expressão de várias CAMs tais como L-selectina em neutrófilos humanos (DIAZ-GONZALEZ et al., 1995), E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 em HUVECs (SAKAI, 1996), P-selectina em células endoteliais venulares de SHR (MARTINEZ et al., 2004, 2005) e CD11/CD18 em granulócitos de SHR (MARTINEZ et al., 2005). De fato, a redução da aderência e migração leucocitárias em SHR observadas em nosso estudo após administração de diclofenaco ocorreu em paralelo com a redução da expressão de ICAM-1 em células endoteliais de vênulas pós-capilares, confirmando trabalhos anteriores do nosso grupo (MARTINEZ et al., 2004, 2005). Por outro lado, em ratos Wistar a redução da aderência e migração leucocitárias não foi acompanhada por redução de nenhuma das moléculas de aderência investigadas no presente estudo, ICAM-1, PECAM-1, CD18, P-selectina ou L-selectina. Dessa forma, o mecanismo pelo qual diclofenaco reduz aderência e migração leucocitárias em ratos Wistar permanece indefinido. Podemos, contudo, sugerir que esse agente

pode provocar redução da expressão de outras CAMs dentre elas E-selectina ou VCAM-1, visto que Sakai (1996) demonstrou redução da expressão dessas moléculas em HUVECs e conseqüente diminuição da aderência da linhagem de células promielocíticas humanas HL60 a essas células endoteliais, *in vitro*.

A redução do rolamento leucocitário em SHR observada nesse estudo após tratamento com diclofenaco não decorreu da redução da expressão de L- ou P-selectina, podendo tal efeito se dever à redução da expressão de outras CAMs como, por exemplo, E-selectina, uma vez que o diclofenaco é capaz de reduzir a expressão da mesma (SAKAI, 1996).

Corroborando com nossos dados, Martinez et al. (2004, 2005) também não observaram efeito do diclofenaco sobre a expressão de L-selectina contudo, demonstraram que o diclofenaco reduz a expressão de P-selectina em SHR. A diferença obtida no presente trabalho em relação aos dados de Martinez et al. (2004, 2005) pode ser decorrente de não termos utilizado estímulo inflamatório prévio, a não ser o estímulo cirúrgico, para determinação da expressão de P-selectina, ao contrário do que foi realizado naqueles trabalhos quando foi injetado TNF- α 2 h antes da coleta do tecido. No nosso caso a ausência de estímulo exógeno, prévio à realização da imunohistoquímica, estaria mais de acordo com as condições em que foi realizado o experimento de rolamento leucocitário, cujos resultados buscamos explicar determinando a expressão da P-selectina.

O diclofenaco administrado a ratos Wistar, ao contrário do que foi visto em SHR, não causou alteração do rolamento leucocitário, o que pode ser explicado pela dose de diclofenaco utilizada - 1 mg/kg/dia (v. o.) - uma vez que na dose de 2,5 mg/kg/dia (i. p.), Martinez et al. (1999) demonstraram redução do rolamento leucocitário em vênulas da fáscia espermática desses ratos. De fato, Sakai (1996) demonstrou que a atividade inibitória do diclofenaco sobre a expressão de CAMs depende da dose empregada. Portanto, doses elevadas de diclofenaco poderiam mais facilmente reduzir a expressão de selectinas e, conseqüentemente, o rolamento leucocitário em ratos Wistar. A opção de administrar a dose menor de diclofenaco a ratos Wistar nesse estudo deveu-se ao fato de querermos utilizar a mesma dose usada em SHR, a qual foi previamente demonstrado reduzir o rolamento leucocitário nesses ratos (Martinez et al., 2004, 2005).

A maior sensibilidade ao efeito do diclofenaco sobre o rolamento leucocitário observada em SHR em relação a ratos Wistar pode estar relacionada à maior

atividade glicocorticóide presente em SHR (SUZUKI et al., 1994), pois a resultante das ações antiinflamatórias de ambos, glicocorticóide e diclofenaco, seria maior em SHR do que em ratos Wistar. Dessa forma, a utilização de uma determinada dose de diclofenaco em SHR e ratos Wistar poderia causar efeitos antiinflamatórios observáveis nos primeiros, mas não nos últimos. De fato, observamos redução do rolamento leucocitário em SHR, sem qualquer efeito mensurável em ratos Wistar além de redução da expressão de ICAM-1 em SHR, mas não em ratos Wistar, utilizando a mesma dose do antiinflamatório nas duas linhagens.

Tem sido descrita ação do diclofenaco reduzindo peroxidação lipídica (CHAKRABORTY et al., 2006), seqüestrando radicais livres (TANG e LIU, 2006) e inibindo a geração de ânions superóxido por leucócitos polimorfonucleares (YUDA et al., 1991), bem como inibindo a ativação do NF- κ B (KOOP e GHOSH, 1995). Dessa forma, assim como a anlodipina, propriedades anti-oxidantes do diclofenaco poderiam contribuir na redução da expressão de CAMs e conseqüentemente na redução da aderência e migração leucocitárias observadas no presente estudo tanto em SHR como em ratos Wistar.

Outros parâmetros que poderiam contribuir para explicar a ação do diclofenaco reduzindo rolamento, aderência e migração leucocitários em SHR bem como aderência e migração leucocitárias em ratos Wistar: a) velocidade e número total de leucócitos e, principalmente de neutrófilos, primeiros leucócitos participantes no desenvolvimento do processo inflamatório; b) velocidade do fluxo sanguíneo e taxa de atrito venular. Como esses parâmetros não foram modificados pela administração do antiinflamatório, podemos excluir a participação dos mesmos em nossos resultados. Martinez et al. (1999, 2004, 2005) também não observaram alteração desses parâmetros após administração de diclofenaco a SHR ou ratos Wistar.

INTERAÇÃO ANLODIPINA E DICLOFENACO NA PRESSÃO ARTERIAL E NA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

A administração de diclofenaco a SHR não influenciou o efeito redutor do nível de PA promovido pelo tratamento com anlodipina 10 mg/kg, quando associado ao mesmo. Isso talvez esteja relacionado à dose de diclofenaco utilizada (1 mg/kg/dia), que apesar de diminuir a migração leucocitária, pode não ter sido suficiente para alterar a função hemodinâmica renal, com conseqüente retenção de

água, que poderia causar alteração da PA. De fato, Whelton (1999) demonstrou que efeitos colaterais renais decorrentes da utilização de AINEs geralmente ocorrem numa fração pequena de pacientes de maneira dependente da dose. Dessa forma, possivelmente a dose de diclofenaco utilizada no presente estudo foi insuficiente para contrapor-se ao efeito anti-hipertensivo da anlodipina.

Da mesma forma, diclofenaco não modificou o efeito da anlodipina 10 mg/kg sobre a PA em ratos Wistar.

O resultado mais interessante do nosso estudo, o efeito da anlodipina prejudicando a redução da aderência e migração leucocitárias promovidas pelo diclofenaco parece dever-se ao efeito da anlodipina sobre a expressão da molécula de aderência ICAM-1, quando em presença do diclofenaco, visto que ambos os fármacos reduziram a expressão dessa molécula quando administrados isoladamente porém, quando combinados, tal redução não foi mais observada. Semelhante interação foi observada no nosso laboratório com outro anti-hipertensivo, o losartan, antagonista do receptor AT1 da Ang II, que quando administrado combinado com diclofenaco em SHR, prejudicou a migração leucocitária e também a redução da expressão de CD11/CD18 promovidas pelo diclofenaco (MARTINEZ et al., 2005). Já em ratos Wistar o mecanismo da redução do efeito do diclofenaco sobre a aderência e migração leucocitárias provocado pela administração conjunta de anlodipina permanece indefinido e não envolve as moléculas de aderência ICAM-1, PECAM-1, P-selectina, CD11/CD18 ou L-selectina.

Outra possibilidade para explicar a redução do efeito do diclofenaco quando administrado concomitantemente à anlodipina seria a interação farmacocinética, com redução dos níveis plasmáticos do diclofenaco causado pelo anti-hipertensivo, aumentando sua metabolização, aumentando sua excreção ou diminuindo sua absorção.

Interação na fase de absorção pôde ser descartada, visto que a administração dos fármacos foi feita com intervalo de 30 min. Tal intervalo é suficiente para permitir absorção quase que completa do diclofenaco (TORRES-LOPEZ et al., 1997). As curvas de concentração plasmática do diclofenaco administrado isoladamente ou em conjunto com a anlodipina foram semelhantes tanto em SHR como em ratos Wistar. Dessa forma, interação nas fases de metabolização ou excreção dos fármacos também parece não contribuir para explicar a interação entre diclofenaco e anlodipina em SHR ou ratos Wistar. Esses resultados indicam que interação

farmacocinética não explica a redução do efeito do diclofenaco sobre o comportamento leucocitário quando associado a anlodipina nesses ratos.

HIDRALAZINA

Demonstramos que de modo similar à anlodipina, hidralazina, apesar de não alterar o número de “rollers”, reduz aderência e migração leucocitárias em SHR. Tendo em vista que ambos os anti-hipertensivos provocaram efeito semelhante na PA, poderíamos inferir que a redução da PA é importante para o efeito inibitório desses fármacos sobre o comportamento leucocitário. Isso parece ser verdade para a anlodipina, mas não para a hidralazina, visto que quando reduzimos a dose de ambos os fármacos de maneira que eles não mais reduziram a PA de SHR, hidralazina, mas não anlodipina, continuou sendo capaz de reduzir aderência e migração leucocitárias. Portanto, alguma característica particular da molécula de hidralazina, independente de sua ação reduzindo a PA, parece ter papel importante sobre o comportamento leucocitário. Além disso, observamos que, assim como anlodipina, o mecanismo provável da ação da hidralazina reduzindo aderência e migração leucocitárias em SHR parece decorrer da redução da expressão de ICAM-1. Tal redução, pode ter decorrido de suas propriedades anti-oxidantes (DAIBER et al., 2005; LEIRO et al., 2004; PU et al., 2003) que, conforme explicado anteriormente, poderiam reduzir a atividade do NF- κ B e, conseqüentemente, a expressão de ICAM-1. Neves et al. (2005) demonstraram que hidralazina é capaz de reduzir a expressão de NF- κ B e também da molécula de aderência VCAM-1 em ratos infundidos com Ang II. Sanz-Rosa et al. (2004) observaram que hidralazina, associada a hidroclorotiazida e reserpina, aumenta a expressão do inibidor kappaB (I κ B), inibidor endógeno do NF- κ B, em aorta de SHR, apesar de não alterar a expressão de NF- κ B. Portanto, baseado nesses trabalhos, podemos sugerir que a hidralazina reduz a atividade do NF- κ B, diminuindo a expressão de ICAM-1 e, dessa forma, causa redução da aderência e migração leucocitárias em SHR. Entretanto experimentos adicionais devem ser realizados para aceitar ou rejeitar essa hipótese.

À semelhança do que ocorreu com anlodipina, a hidralazina reduziu a migração leucocitária também em ratos Wistar contudo, diferentemente da redução de ICAM-1 e PECAM-1 observada com anlodipina, hidralazina causou redução da expressão de P-selectina em ratos Wistars. Tem-se demonstrado que a ativação da

PSGL-1, principal ligante da P-selectina expressa em leucócitos, induz sinais intracelulares que levam à ativação da integrina CD11/CD18, o que a torna mais ávida para a ligação com ICAM-1. Dessa forma ocorreria maior propensão dos leucócitos de aderirem às células endoteliais e conseqüentemente migrarem para os tecidos alvo (ATARASHI et al., 2005). Contudo, com a redução da expressão de P-selectina, haveria menor ativação da PSGL-1 e, portanto, da integrina CD11/CD18, dessa forma, reduzindo a avidéz de ligação da integrina com a ICAM-1 e conseqüentemente reduzindo aderência e migração leucocitárias. Sugerimos, então que a redução da expressão de P-selectina causada pela hidralazina poderia explicar a redução da migração leucocitária observada com a administração desse fármaco a ratos Wistar.

Apesar de demonstrarmos que a hidralazina reduziu a expressão de P-selectina em ratos Wistar, não observamos diminuição do rolamento leucocitário. Tal resultado poderia ser explicado pelo aumento da expressão de L-selectina, observado após administração da hidralazina, de modo que o balanço final da regulação da expressão de P- e L-selectinas sobre o rolamento leucocitário seria nulo. De fato, Ridger et al. (2005) demonstraram que L- e P-selectinas podem colaborar para manter o rolamento leucocitário *in vivo* em condições em que a ligação P-selectina e seu ligante PSGL-1 é inibida. Dessa forma sugerimos que o aumento da expressão de L-selectina poderia suprir a redução da expressão de P-selectina observada após administração de hidralazina em ratos Wistar de modo a não haver alteração do rolamento leucocitário.

Ao contrário do que foi visto em SHR, hidralazina administrada numa dose que não reduz a PA em ratos Wistar (~ 3,5 mg/kg) não foi capaz de reduzir a migração leucocitária. Sugerimos então que mecanismos diferentes poderiam estar envolvidos na redução da migração leucocitária causada pela hidralazina em ratos Wistar e SHR visto que a redução da migração parece ser influenciada por redução dos níveis de PA em ratos Wistar normotensos, mas não em SHR.

Parâmetros como: velocidade e número de leucócitos circulantes, velocidade do fluxo sangüíneo e taxa de atrito venular, cujas alterações poderiam contribuir para explicar alterações na migração leucocitária, não foram modificados após administração de hidralazina tanto em SHR como em ratos Wistar. Portanto, tanto em SHR como em ratos Wistar a redução da migração leucocitária causada pela

hidralazina parece decorrer principalmente da redução da expressão de moléculas de aderência, ICAM-1 em SHR, e P-selectina, em ratos Wistar.

Nossos resultados, aliados a resultados anteriores do laboratório, sugerem que o uso concomitante de diclofenaco e fármacos anti-hipertensivos em indivíduos hipertensos deve ser acompanhado de perto devido ao potencial de interação entre esses agentes, interação essa manifestada por redução do efeito do antiinflamatório sobre o comportamento leucocitário.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que:

- 1) Diclofenaco não interfere na redução da PA causada pela anlodipina;
- 2) Anlodipina reduz migração leucocitária em SHR, de maneira dependente da redução da PA, por causar redução da expressão de ICAM-1;
- 3) Anlodipina reduz migração leucocitária em ratos Wistar por reduzir a expressão tanto de ICAM-1 como de PECAM-1;
- 4) Diclofenaco reduz rolamento, aderência e migração leucocitários em SHR e aderência e migração leucocitárias em ratos Wistar sem interferir na expressão de moléculas de aderência como ICAM-1, PECAM-1, CD11/CD18, L-selectina e P-selectina, no número de leucócitos circulantes ou na taxa de atrito venular;
- 5) SHR parecem ser mais sensíveis a algumas ações antiinflamatórias do diclofenaco do que ratos Wistar, visto que, administrado na mesma dose a ambos, reduziu rolamento leucocitário bem como a expressão de ICAM-1 em SHR, mas não em ratos Wistar;
- 6) A anlodipina reduz o efeito antimigratório do diclofenaco de potássio tanto em SHR como em ratos Wistar;
- 7) O mecanismo pelo qual anlodipina reduz o efeito antimigratório do diclofenaco em SHR parece ser diferente daquele em ratos Wistar. Em SHR, mas não em ratos Wistar, tal mecanismo advém do efeito da anlodipina prejudicando a redução da expressão de ICAM-1 causada pelo diclofenaco. Em ratos Wistar, o mecanismo permanece não elucidado, não envolvendo interação desses fármacos com moléculas de aderência como ICAM-1, PECAM-1, CD11/CD18, L-selectina e P-selectina, número de leucócitos circulantes ou na taxa de atrito venular. Interação farmacocinética, que poderia explicar a interação farmacológica, não ocorre quando da associação dos fármacos tanto em SHR como em ratos Wistar;

8) Hidralazina reduz migração leucocitária em SHR de maneira independente da diminuição da PA, ao contrário do observado em ratos Wistar, o que sugere que mecanismos diferentes parecem mediar a ação antimigratória desse fármaco em ambas as linhagens;

9) A redução da migração leucocitária causada pela hidralazina tanto em SHR como em ratos Wistar ocorre por mecanismos diferentes. Em SHR, mas não em ratos Wistar, a redução parece ser decorrente de diminuição da expressão de ICAM-1; em ratos Wistar, mas não em SHR, a redução da migração pode ser consequência de diminuição da expressão de P-selectina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAIR-KIRK, T. L.; ATKINSON, J. J.; BROEKELMANN, T. J.; DOI, M.; TRYGGVASON, K.; MINER, J. H.; MECHAM, R. P.; SENIOR, R. M. A site on laminin $\alpha 5$, aqarsaaskvkvs mkf, induces inflammatory cell production of matrix metalloproteinase-9 and chemotaxis. **J. Immunol.**, v. 171, n. 1, p. 398-406, 2003.

ALLHAT OFFICERS AND COORDINATORS FOR THE ALLHAT COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. THE ANTIHYPERTENSIVE AND LIPID- LOWERING TREATMENT TO PREVENT HEART ATTACK TRIAL. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: the Antihypertensive and Lipid Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). **JAMA**, v.288, n. 23, p. 2981-2997, 2002.

AL-TUWAIJRI, A. S.; MUSTAFA, A. A. Verapamil enhances the inhibitory effect of diclofenac on the chemiluminescence of human polymorphonuclear leukocytes and carrageenan-induced rat's paw oedema. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 14, n. 1, p. 83-91, 1992.

ATARASHI, K.; HIRATA, T.; MATSUMOTO, M.; KANEMITSU, N.; MIYASAKA, M. Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. **J. Immunol.**, v. 174, n. 3, p. 1424-1432, 2005.

BERECEK, K. H.; STOCKER, M.; GROSS, F. Changes in renal vascular reactivity at various stages of deoxycorticosterone hypertension in rats. **Circ. Res.**, v. 46, n. 5, p. 619-624, 1980.

BERGER, R. G. Intelligent use of NSAIDs - where do we stand? **Exp. Opin. Pharmacother.**, v. 2, n. 1, p. 19-30, 2001.

BOHR, D. F. Reactivity of vascular smooth muscle from normal and hypertensive rats: effect of several cations. **Fed. Proc.**, v. 33, n. 2, p. 127-132, 1974.

BOHR, D. F.; WEBB, R. C. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. **Am. J. Med.**, v. 77, n. 4A, p. 3-16, 1984.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOSSE, R.; VESTWEBER, D. Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 12, p. 3019-3024, 1994.

BOULOUMIE, A.; BAUERSACHS, J.; LINZ, W.; SCHÖLKENS, B. A.; WIEMER, G.; FLEMING, I. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 934-941, 1997.

BROOKS, P. M.; HILL, W.; GEDDES, R. Diclofenac and ibuprofen in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Med. J. Aust.**, v. 1, n. 1, p. 29-30, 1980.

CAMPBELL, J. J.; HEDRICK, J.; ZLOTNIK, A.; SIANI, M. A.; THOMPSON, D. A.; BUTCHER, E. C. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 381-384, 1998.

CAMPBELL, J. J.; QIN, S.; BACON, K. B.; MACKAY, C. R.; BUTCHER, E. C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors. Differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. **J. Cell Biol.**, v. 134, n. 1, p. 255-266, 1996.

CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. **J. Cell Biol.**, v. 167, n. 2, p. 377-388, 2004.

CARVALHO, M. H.; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; CORDELLINI, S. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **J. Hypertens.**, v. 5, n. 3, p. 377-382, 1987.

CEPINSKAS, G.; SANDIG, M.; KVIETYS, P. R. PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 1937-1945, 1999.

CHAKRABORTY, S.; KAR, S. K.; ROY, K.; SENGUPTA, C. Exploring effects of different nonsteroidal antiinflammatory drugs on malondialdehyde profile. **Acta Pol. Pharm.**, v. 63, n. 2, p. 83-88, 2006.

CINAMON, G.; SHINDER, V.; SHAMRI, R.; ALON, R. Chemoattractant signals and $\beta 2$ integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration. **J. Immunol.**, v. 173, n. 12, p. 7282-7291, 2004.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Philadelphia: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-78.

COLLINS, T.; READ, M. A.; NEISH, A. S.; WHITLEY, M. Z.; THANOS, D.; MANIATIS, T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. **FASEB J.**, v. 9, n. 10, p.899-909, 1995.

COMINACINI, L.; GARBIN, U.; FRATTA PASINI, A.; PAULON, T.; DAVOLI, A.; CAMPAGNOLA, M.; MARCHI, E.; PASTORINO, A. M.; GAVIRAGHI, G.; LO CASCIO, V. Lacidipine inhibits the activation of the transcription factor NF-kappa B and the expression of adhesion molecules induced by pro-oxidant signals on the endothelial cells. **J. Hypertens.**, v. 15, n. 12, p. 1633-1639, 1997.

COMINACINI, L.; PASINI, A. F.; PASTORINO, A. M.; GARBIN, U.; DAVOLI, A.; RIGONI, A.; CAMPAGNOLA, M.; TOSETTI, M. L.; ROSSATO, P.; GAVIRAGHI, G. Comparative effects of different dihydropyridines on the expression of adhesion molecules induced by TNF-alpha on endothelial cells. **J. Hypertens.**, v. 17, n. 12, p. 1837-1841, 1999.

DAIBER, A.; OELZE, M.; COLDEWEY, M.; KAISER, K.; HUTH, C.; SCHILDKNECHT, S.; BACHSCHMID, M.; NAZIRISADEH, Y.; ULLRICH, V.; MÜLSCH, A.; MÜNDEL, T.; TSILIMINGAS, N. Hydralazine is a powerful inhibitor of peroxynitrite formation as a possible explanation for its beneficial effects on prognosis in patients with congestive heart failure. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 30, n. 4, p. 1865-1874, 2005.

DANGERFIELD, J.; LARBI, K. Y.; HUANG, M. T.; DEWAR, A.; NOURSHARGH, S. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates $\alpha 6 \beta 1$ on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of $\alpha 6$ integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 9, p. 1201-1211, 2002.

DIAZ-GONZALEZ, F.; GONZALEZ-ALVARO, I.; CAMPANERO, M. R.; MOLLINEDO, F.; DEL POZO, M. A.; MUNOZ, C.; PIVEL, J. P.; SANCHEZ-MADRID, F. Prevention

of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 4, p. 1756-1765, 1995.

DUNN, M. J.; HOOD, V. L. Prostaglandins and the kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 233, n. 3, p. 169-184, 1977.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, v. 18, n. 10, p. 487-492, 1997.

FAGARD, R. H.; VAN DEN ENDEN, M.; LEEMAN, M.; WARLING, X. Survey on treatment of hypertension and implementation of World Health Organization/International Society of Hypertension risk stratification in primary care in Belgium. **J. Hypertens.**, v. 20, n. 7, p. 1297-1302, 2002.

FIEBIG, E.; LEY, K.; ARFORS, K. E. Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. **Int. J. Microcirc. Clin. Exp.**, v. 10, n. 2, p. 127-144, 1991.

FOLKOW, B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. **Hypertension**, v. 16, n. 1, p. 89-101, 1990.

FORTES, Z. B.; FARSKY, S. P.; OLIVEIRA, M. A.; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40, n. 10, p. 1267-1273, 1991.

FOTHERBY, M. D.; HARPER G. D.; POTTER, J. F. General practitioners' management of hypertension in elderly patients. **BMJ**, v. 305, n. 6856, p. 750-752, 1992.

FRIMAN, C.; JOHNSTON, C.; CHEW, C.; DAVIS, P. Effect of diclofenac sodium, tolfenamic acid and indomethacin on the production of superoxide induced by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in normal human polymorphonuclear leukocytes. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 15, n. 1, p. 41-46, 1986.

FRISHMAN, W. H. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy on blood pressure and peripheral edema. **Am. J. Cardiol.**, v. 89, n. 6A, p. 18D-25D, 2002.

FUJIMURA, A.; SHIGA, T.; OHASHI, K.; EBIHARA, A. Chronopharmacology of amlodipine in rats. **Life Sci.**, v. 53, n. 7, p. 595-602, 1993.

GARDINER, S. M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. **Hypertension**, v. 15, n. 5, p. 486-492, 1990.

GE, T.; HUGHES, H.; JUNQUERO, D. C.; WU, K. K.; VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. **Circ. Res.**, v. 76, n. 6, p. 1003-1010, 1995.

GONZALEZ-AMARO, R.; SANCHEZ-MADRID, F. Drugs, inflammation and cell adhesion receptors. **Exp. Opin. Pharmacother.**, v. 2, n. 1, p. 3-17, 2001.

GRUNFELD, S.; HAMILTON, C. A.; MESAROS, S.; MCCLAIN, S. W.; DOMINICZAK, A. F.; BOHR, D. F. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. **Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 854-857, 1995.

GUYTON, A. C.; COLEMAN, T. G.; COWLEY, A. V.; SCHEEL, K. W.; MANNING, R. D.; NORMAN, R. A. Arterial pressure regulation: Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and hypertension. **Am. J. Med.**, v. 52, n. 5, p. 584-594, 1972.

HALLER, H.; SCHAPER, D.; ZIEGLER, W.; PHILIPP, S.; KUHLMANN, M.; DISTLER, A.; LUFT, F. C. Low-density lipoprotein induces vascular adhesion molecule expression on human endothelial cells. **Hypertension**, v. 25, n. 1, p. 511-516, 1995.

HANAUER, S. B.; FEAGAN, B. G.; LICHTENSTEIN, G. R. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. **Lancet**, v. 359, n. 9317, p. 1541-1549, 2002.

HEAGERTY, A. M.; AALKJAER, C.; BUND, S. J.; KORSGAARD, N.; MULVANY, M. J. Small artery structure in hypertension – Dual processes of remodeling and growth. **Hypertension**, v. 21, n. 4, p. 391-397, 1993.

HENRY, P. D.; BENTLEY, K. I. Suppression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits treated with nifedipine. **J. Clin. Invest.**, v. 68, n. 5, p. 1366-1369, 1981.

HINTZE, T. H.; VATNER, S. F. Comparison of effects of nifedipine and nitroglycerin on large and small coronary arteries and cardiac function in conscious dogs. **Circ. Res.**, v. 52, n. 2, p. 1139-1146, 1983.

HUANG, A. J.; MANNING, J. E.; BANDAK, T. M.; RATAU, M. C.; HANSER, K. R.; SILVERSTEIN, S. C. Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. **J. Cell Biol.**, v. 120, n. 6, p. 1371-1380, 1993.

IGASE, M.; STRAWN, W. B.; GALLAGHER, P. E.; GEARY, R. L.; FERRARIO, C. M. Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 289, n. 3, p. H1013-H1019, 2005.

JOHNSON, A. G. NSAIDs and blood pressure. Clinical importance for older patients. **Drugs Aging**, v. 12, n. 1, p. 17-27, 1998.

JOHNSON, A. G.; NGUYEN, T. V.; DAY, R. O. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. **Ann. Intern. Med.**, v. 121, n. 4, p. 289-300, 1994.

KALLWELLIS, K.; GREMLER, R.; GÜNTHER, S.; PÄTH, G.; WALTHER, R. Tumor Necrosis Factor Alpha Induces the Expression of the Nuclear Protein p8 via a Novel NFkappaB Binding Site within the Promoter. **Horm. Metab. Res.**, v. 38, n. 9, p. 570-574, 2006.

KATO, T.; IWANA, Y.; OKUMURA, K.; HASHIMOTO, H.; ITO, T.; SATAKE, T. Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. **Hypertension**, v. 15, n. 5, p. 475-482, 1990.

KERINS, D. M.; ROBERTSON, R. M.; ROBERTSON, D. Fármacos utilizados no tratamento da isquemia miocárdica. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds.) **Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003, p. 635-656.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v. 5, n. 6, p. 881-886, 1983.

KOPP, E. B.; GHOSH, S. NF-kB and rel proteins in innate immunity. **Adv. Immunol.**, v. 58, p. 1-27, 1995.

KORNER, P. I.; BOBIK, A.; ANGUS, J. A.; ADAMS, M. A.; FRIBERG, P. Resistance control in hypertension. **J. Hypertens. Suppl.**, v. 7, n. 4, p. S125-S134, 1989.

KRIEGER, E.; MICHELINI, L. C. Dados básicos sobre a manutenção da pressão arterial. **Rev. Soc. Cardiol. Est. S. Paulo**, v. 4, p. 9-17, 1992.

KRIEGLSTEIN, C.; GRANGER, D. N. Adhesion molecules and their role in vascular disease. **Am. J. Hypertens.**, v. 14, n. 6, p. 44S-54S, 2001.

LALA, L. G.; D'MELLO, P. M.; NAIK, S. R. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on interaction of "Trikatu" with diclofenac sodium. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, n. 2/3, p. 277-280, 2004.

LEDGERWOOD, E. C.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. **Lab Invest.**, v. 79, n. 9, p. 1041-1050, 1999.

LEHMANN, G.; REINIGER, G.; BEYERLE, A.; RUDOWLPH, W. Pharmacokinetics and additional anti-ischaemic effectiveness of amlodipine, a once daily calcium antagonist, during acute and long-term therapy of stable angina pectoris in patients pre-treated with a beta-blocker. **Eur. Heart J.**, v. 14, n. 11, p. 1531-1535, 1993.

LEIRO, J. M.; ALVAREZ, E.; ARRANZ, J. A.; CANO, E.; ORALLO, F. Antioxidant activity and inhibitory effects of hydralazine on inducible NOS/COX-2 gene and protein expression in rat peritoneal macrophages. **Int. Immunopharmacol.**, v. 4, n. 2, p. 163-177, 2004.

LEWINSOHN, D. M.; BARGATZE, R. F.; BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. **J. Immunol.**, v. 138, n. 12, p. 4313-4321, 1987.

LEY, K. Leukocyte recruitment as seen by intravital microscopy. In: _____. **Physiology of Inflammation**. Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 303-337.

LICHTLEN, P. R.; HUGENHOLTZ, P. G.; RAFFLENBEUL, W.; HECKER, H.; JOST, S.; DECKERS, J. W. Retardation of angiographic progression of coronary artery disease by nifedipine. Results from the International Nifedipine Trial on Anti-atherosclerotic Therapy (INTACT). INTACT group investigators. **Lancet**, v. 335, n. 8698, p. 1109-1113, 1990.

LINDER, L.; KIOWSKI, W.; BUHLER, F. R.; LUSCHER, T. F. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: Blunted response in essential hypertension. **Circulation**, v. 81, n. 6, p. 1762-1767, 1990.

LOCKETTE, W.; OTSUHA, Y.; CARRETERO, O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. **Hypertension**, v. 8, n. 6, p. 1161-1166, 1986.

LONGHURST, P. A.; RICE, P. J.; TAYLOR, D. A.; FLEMING, W. W. Sensitivity of caudal arteries and the mesenteric vascular bed to norepinephrine in DOCA-salt hypertension. **Hypertension**, v. 12, n. 2, p. 133-142, 1988.

LÜSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344-348, 1986.

LÜSCHER, T. F.; RAIJ, L.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. **Hypertension**, v. 9, n. 2, p. 157-163, 1987.

LYDTIN, H.; TRENKWALDER, P. Pharmacological effects of calcium antagonists - cardiovascular system. In: _____. **Calcium-Antagonists: A Critical Review**. Heidelberg: Springer, 1990. p. 29-52.

MAINI, R.; ST CLAIR, E. W.; BREEDVELD, F. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomized phase III trial. ATTRACT Study Group. **Lancet**, v. 354, n. 9194, p. 1932-1939, 1999.

MAMDOUH, Z.; CHEN, X.; PIERINI, L. M.; MAXFIELD, F. R.; MULLER, W. A. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 748-753, 2003.

MARTINEZ, L. L.; OLIVEIRA, M. A.; FORTES, Z. B. Influence of verapamil and diclofenac on leukocyte migration in rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4, p. 997-1001, 1999.

MARTINEZ, L. L.; OLIVEIRA, M. A.; MIGUEL, A. S.; RASTELLI, V. M.; CRUZ, J. W.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B. Losartan attenuates the antimigratory effect of diclofenac in spontaneously hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 46, n. 2, p. 190-199, 2005.

MARTINEZ, L. L.; OLIVEIRA, M. A.; MIGUEL, A. S.; RASTELLI, V. M.; WALBER, J.; CRUZ, M. C.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H.; NIGRO, D.; FORTES, Z. B. Enalapril interferes with the effect of diclofenac on leukocyte-endothelium interaction in hypertensive rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 43, n. 2, p. 258-265, 2004.

MATSUMORI, A.; NUNOKAWA, Y.; SASAYAMA, S. Nifedipine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB. **Life Sci.**, v. 67, n. 21, p. 2655-2661, 2000.

MILLAN, J.; HEWLETT, L.; GLYN, M.; TOOMRE, D.; CLARK, P.; RIDLEY, A. J. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM 1 to caveola- and F actin rich domains. **Nat. Cell Biol.**, v. 8, n. 2, p. 113-123, 2006.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 327-334, 2003.

MULLIGAN, M. S.; VARANI, J.; DAME, M. K.; LANE, C. L.; SMITH, C. W.; ANDERSON, D. C.; WARD, P. A. Role of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) in neutrophil-mediated lung injury in rats. **J. Clin. Invest.**, v. 88, n. 4, p. 1396-1406, 1991.

MULVANY, M. J. Resistance vessel structure in hypertension: growth or remodeling? **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 22, p. S44-S47, 1993. Suppl5.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-852, 2002.

NEBE, B.; HOLZHASSEN, C.; RYCHLY, J.; URBASZEK, W. Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, v. 16, n. 3, p. 183-193, 2002.

NEVES, M. F.; AMIRI, F.; VIRDIS, A.; DIEP, Q.; SCHIFFRIN, E. L. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis and hypertrophy. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 83, n. 11, p. 999-1006, 2005.

NIGRO, D.; FORTES, Z. B.; SCIVOLETTO, R.; BARBEIRO, H. V.; CARVALHO, M. H. C. Sex-related differences in the response of spontaneously hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor. **Endothelium**, v. 5, n. 1, p. 63-71, 1997.

OFOSU-APPIAH, W.; SFEIR, G.; SMITH, D.; RICHARD, T. Neutrophil-mediated damage to vascular endothelium in the spontaneously hypertensive rat. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 83, n. 3, p. 293-301, 1997.

OLIVEIRA, C. H.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R. E.; ABIB, E.; MENDES G. D.; DA SILVA, D. R.; DE NUCCI, G. Lansoprazole quantification in human plasma by

liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 783, n. 2, p. 453-459, 2003.

PANES, J.; KUROSE, I.; RODRIGUES-VACA, M. D.; ANDERSON, D. C.; MIYASAKA, M.; TSO, P.; GRANGER, D. N. Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. **Circulation**, v. 93, n. 1, p. 161-167, 1996.

PADUA, A. A.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R. E.; REZENDE, V. M.; MENDES, G. D.; DE NUCCI, G. Lisinopril quantification in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 809, n. 2, p. 211-216, 2004.

PANZA, J. A.; CASINO, P. R.; KILCOYNE, C. M.; QUYYUMI, A. A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 87, n. 5, p. 1468-1474, 1993.

PARISSIS, J. T.; KOROYESIS, S.; GIAZITZOGLU, E.; KALIVAS, P.; KATRITSIS, D. Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. **Int. J. Cardiol.**, v. 83, n. 1, p. 13-21, 2002.

PARISSIS, J. T.; VENETSANO, K. F.; KALANTZI, M. V.; MENTZIKOF, D. D.; KARAS, S. M. Serum profiles of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and C-C chemokines in hypertensive patients with or without significant hyperlipidemia. **Am. J. Cardiol.**, v. 85, n. 6, p. 777-779, 2000.

PENNINGTON, J. E.; KEMMERICH, B.; KAZANJIAN, P. H.; MARSH, J. D.; BOERTH, L. W. Verapamil impairs human neutrophil chemotaxis by a non-calcium mediated mechanism. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 108, n. 1, p. 44-52, 1986.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PHILLIPSON, M.; HEIT, B.; COLARUSSO, P.; LIU, L.; BALLANTYNE, C. M.; KUBES, P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 12, p. 2569-2575, 2006.

PICKERING, S. G. Hypertension: definitions, natural histories and consequences. In: LARAGH, J. H.; BRENNER, B. M. (Ed.) **Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management**. New York: Raven Press, 1995. v. 1.

POLONIA, J.; BOAVENTURA, I.; GAMA, G.; CAMOES, I.; BERNARDO, F.; ANDRADE, P.; NUNES, J. P.; BRANDAO, F.; CERQUEIRA-GOMES, M. Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function and 24-hour blood pressure-reducing effects of enalapril and nifedipine gastrointestinal therapeutics system in hypertensive patients. **J. Hypertens.**, v. 13, n. 8, p. 925-931, 1995.

POPE, J. E.; ANDERSON, J. J.; FELSON, D. T. A meta-analysis of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure. **Arch. Intern. Med.**, v. 153, n. 4, p. 477-484, 1993.

PRADOS, P.; SANTA, T.; FUKUSHIMA, T.; HOMMA, H.; KASAI, C.; MARTIN, M. A.; DEL CASTILLO, B.; IMAI, K. Age-related weakening of baroreflex-mediated sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats in response to blood pressure reduction. **Hypertens. Res.**, v. 21, n. 3, p. 147-153, 1998.

PU, Q.; NEVES, M. F.; VIRDIS, A.; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. **Hypertension**, v. 42, n. 1, p. 49-55, 2003.

RAPOPORT, R. M.; WILLIAMS, S. P. Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **Hypertension**, v. 28, n. 1, p. 64-75, 1996.

RAY, W. A.; SCHAFFNER, W.; OATES, J. A. Therapeutic choice in the treatment of hypertension. Initial treatment of newly diagnosed hypertension and secular trends in the prescribing of antihypertensive medications for medicaid patients. **Am. J. Med.**, v. 81, n. 6C, p. 9-16, 1986.

REES, D. D.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, n. 9, p. 3375-3378, 1989.

RIDGER, V. C.; HELLEWELL, P. G.; NORMAN, K. E. L- and P-selectins collaborate to support leukocyte rolling in vivo when high-affinity P-selectin-P-selectin glycoprotein ligand-1 interaction is inhibited. **Am. J. Pathol.**, v. 166, n. 3, p. 945-952, 2005.

RUILOPE, L. M. Long-term protection in at-risk hypertensive patients: a role for nifedipine GITS? **Blood Press**, v. 11, n. 2, p.106-109, 2002.

RUOFF, G. E. The impact of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on hypertension: Alternative analgesics for patients at risk. **Clin. Ther.**, v. 20, n. 3, p. 376-386, 1998.

SAKAI, A. Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. **Life Sci.**, v. 58, n. 26, p. 2377-2387, 1996.

SANZ-ROSA, D.; OUBIÑA, M. P.; CEDIEL, E.; DE LAS HERAS, N.; VEGAZO, O.; JIMÉNEZ, J.; LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, n. 1, p. H111-H115, 2005.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W.; SEIFFGE, D.; DELANO, F. A.; SHEN, K.; ZWEIFACH, B. W. Leukocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Hypertension**, v. 17, n. 3, p. 323-330, 1991.

SHEN, K.; DELANO, F. A.; ZWEIFACH, B. W.; SCHIMID-SHONBEIN, G. W. Circulating Leukocyte Counts, Activation, and Degranulation in Dahl Hypertensive Rats. **Circ. Res.**, v. 76, n. 2, p. 276-283, 1995.

SINGHAL, P. C.; SAGAR, P.; GUPTA, S.; ARYA, M.; GUPTA, M.; PRASAD, A.; LOONA, R.; SHARMA, P.; MATTANA, J. Pressure modulates monocyte migration. **Am. J. Hypertens.**, v. 10, n. 11, p. 1297-1301, 1997.

SIRAGY, H. M.; XUE, C.; WEBB, R. L. Beneficial effects of combined benazepril-amlodipine on cardiac nitric oxide, cGMP, and TNF-alpha production after cardiac ischemia. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 47, n. 5, p. 636-642, 2006.

SCHENKEL, A. R.; MAMDOUH, Z.; MULLER, W. A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. **Nat. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 393-400, 2004.

SKOUTAKIS, V. A.; CARTER, C. A.; MICKLE, T. R.; SMITH, V. H.; ARKIN, C. R.; ALISSANTRATOS, J.; PETTY, D. E. Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal anti-inflammatory agent. **Drug Intell. Clin. Pharm.**, v. 22, n. 11, p. 850-859, 1988.

SLOWIK, M. R.; DE LUCA, L. G.; FIER, W.; POBER, J. S. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. **Am. J. Pathol.**, v. 143, n. 6, p. 1724-1730, 1993.

SUEMATSU, M.; SUZUKI, H.; DELANO, F. A.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. The inflammatory aspects of the microcirculation in hypertension: Oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. **Microcirculation**, v. 9, n. 4, p. 259-276, 2002.

SUZUKI, H.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W.; SUEMATSU, M.; DELANO, F. A.; FORREST, M. J.; MIYASAKA, M.; ZWEIFACH, B. W. Impaired leukocyte-endothelial cell interaction in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 24, p. 719-727, 1994.

TADDEI, S.; VIRDIS, A.; MATTEI, P.; SALVETTI, A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. **Hypertension**, v. 21, n. 6, p. 929-933, 1993.

TANG, Y. Z.; LIU, Z. Q. Evaluation of the free-radical-scavenging activity of diclofenac acid on the free-radical-induced haemolysis of human erythrocytes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, n. 5, p. 625-631, 2006.

TAYLOR, S. H. Usefulness of amlodipine for angina pectoris. **Am. J. Cardiol.**, v. 73, n. 3, p. 28A-33A, 1994.

TESFAMARIAM, B.; HALPERN, W. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilation in resistance arteries from hypertensive rats. **Hypertension**, v. 11, n. 5, p. 440-444, 1988.

THAM, D. M.; MARTIN-MCNULTY, B.; WANG, Y. X.; WILSON, D. W.; VERGONA, R.; SULLIVAN, M. E.; DOLE, W.; RUTLEDGE, J. C. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. **Physiol. Genomics**, v. 11, n. 1, p. 21-30, 2002.

TOBA, H.; NAKAGAWA, Y.; MIKI, S.; SHIMIZU, T.; YOSHIMURA, A.; INOUE, R.; ASAYAMA, J.; KOBARA, M.; NAKATA, T. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure-lowering effects of amlodipine and manidipine. **Hypertens. Res.**, v. 28, n. 8, p. 689-700, 2005.

TODD, P. A.; SORKIN, E. M. Diclofenac sodium, a reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 35, n. 3, p. 244-285, 1988.

TORRES-LÓPEZ, J. E.; LOPEZ-MUÑOZ, F. J.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; FLORES-MURRIETA, F. J.; GRANADOS-SOTO, V. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 282, n. 2, p. 685-90, 1997.

TRENCWALDER, P.; RULAND, D.; STENDER, M.; GEBHARD, J.; TRENCWALDER, C.; LYDTIN, H.; HENSE, H. W. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a population over the age of 65 years: results from the Starnberg Study on Epidemiology of Parkinsonism and Hypertension in the Elderly (STEPHY). **J. Hypertens.**, v. 12, n. 6, p. 709-716, 1994.

VAN AMSTERDAM, F. T.; ROVERI, A.; MAIORINO, M.; RATTI, E.; URSINI, F. Lacidipine: a dihydropyridine calcium antagonist with antioxidant activity. **Free Rad. Biol.**, v. 12, n. 3, p. 183-187, 1992.

VAN ZWIETEN, P. A.; PFAFFENFORD, M. Similarities and differences between calcium antagonists: pharmacological aspects. **J. Hypertens.**, v. 11, n. 1, p. S3-S11, 1993.

VATNER, S. F.; HINTZE, T. H. Effects of a calcium-channel antagonist on large and small coronary arteries in conscious dogs. **Circulation**, v. 66, n. 3, p. 579-588, 1982.

VOGEL, S. M.; ORRINGTON-MYERS, J.; BROMAN, M.; MALIK, A. B. De novo ICAM-1 synthesis in the mouse lung: model of assessment of protein expression in lungs. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 291, n. 3, p. L496-L501, 2006.

WATT, P. A.; THURSTON, H. Endothelium-dependent relaxation in resistance vessels from the spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 7, n. 8, p. 661-666, 1989.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989.

WHELTON, A. Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. **Am. J. Med.**, v. 106, n. 5B, p. 13S-24S, 1999.

WHELTON, A. Renal and related cardiovascular effects of conventional and COX-2-specific NSAIDs and non-NSAID analgesics. **Am. J. Ther.**, v. 7, n. 2, p. 63-74, 2000.

WINQUIST, R. J.; BUNTING, P. B.; BASKIN, E. P.; WALLACE, A. A. Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v. 2, n. 5, p. 536-541, 1984.

YAMAGUCHI, M.; SUWA, H.; MIYASAKA, M.; KUMADA, K. Selective inhibition of vascular cell adhesion molecule-1 expression by verapamil in human vascular endothelial cells. **Transplantation**, v. 63, n. 5, p. 759-764, 1997.

YOKOTA, S.; NAITO, Y.; YOSHIDA, H.; OHARA, N.; ADACHI, T.; NARITA, H. Cardioprotective effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, imidapril, and Ca⁺ channel antagonist, amlodipine, in spontaneously hypertensive rats at established stage of hypertension. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 77, n. 1, p. 79-87, 1998.

YOSHII, T.; IWAI, M.; LI, Z.; CHEN, R.; IDE, A.; FUKUNAGA, S.; OSHITA, A.; MOGI, M.; HIGAKI, J.; HORIUCHI, M. Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions. **Hypertens. Res.**, v. 29, n. 6, p. 457-466, 2006.

YOU, D.; LOUFRANI, L.; BARON, C.; LEVY, B.I.; WIDDOP, R.E.; HENRION, D. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 111, n. 8, p. 1006-1011, 2005.

YUDA, Y.; TANAKA, J.; SUZUKI, K.; IGARASHI, K.; SATOH, T. Inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on superoxide generation. **Chem. Pharm. Bull., Tokyo**, v. 39, n. 4, p. 1075-1077, 1991.

ZWEIFACH, B. W.; GRANT, L.; McCLUSKEY, R. T. **The Inflammatory Process**. New York: Academic, 1965.

ANEXOS

ANEXO A – Manuscrito aceito para publicação:
“Amlodipine reduces the antimigratory effect of
diclofenac in spontaneously hypertensive rats”.

Amlodipine Reduces the Antimigratory Effect of Diclofenac in Spontaneously Hypertensive Rats

Stephen Fernandes Rodrigues, MSc, Rosangela Aparecida dosSantos, PhD,
 Maria Aparecida de Oliveira, PhD, Viviani Milan Rastelli, PhD, Gilberto de Nucci, PhD,
 Rita de Cássia Tostes, PhD, Dorothy Nigro, PhD, Maria Helena Carvalho, PhD,
 and Zuleica B. Fortes, PhD

Abstract: Amlodipine, an antihypertensive drug, and diclofenac, an antiinflammatory drug, may generally be combined, particularly in elderly patients; therefore, the potential for their interaction is high. We aim to determine if amlodipine interferes with the antimigratory effect of diclofenac. For this, male spontaneously hypertensive rats (SHRs) were treated with either diclofenac ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 15 d) alone or combined with amlodipine ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 15 d). Leukocyte rolling, adherence, and migration were studied by intravital microscopy. Diclofenac did not change (180.0 ± 2.3), whereas amlodipine combined (163.4 ± 5.1) or not (156.3 ± 4.3) with diclofenac reduced the blood pressure (BP) levels in SHR (183.1 ± 4.4). Diclofenac and amlodipine reduced leukocyte adherence, migration, and ICAM-1 expression, whereas only diclofenac reduced rolling leukocytes as well. Combined with amlodipine, the effect of the diclofenac was reduced. Neither treatment tested increased the venular shear rate or modified the venular diameters, number of circulating leukocytes, P-selectin, PECAM-1, L-selectin, or CD-18 expressions. No difference could be found in plasma concentrations of both drugs given alone or in association. In conclusion, amlodipine reduces leukocyte migration in SHR, reducing endothelial cell ICAM-1 expression. Amlodipine reduces the effect of the diclofenac, possibly by the same mechanism. A pharmacokinetic interaction as well as an effect on the other adhesion molecules tested could be discarded.

Key Words: spontaneously hypertensive rats, amlodipine, diclofenac, leukocyte-endothelial interaction, ICAM-1

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2008;0:000–000)

INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) has become the main cause of death worldwide,^{1,2} and hypertension is one of the most important modifiable risk factors for CVD.^{3,4}

Received for publication September 19, 2007; accepted February 7, 2008.
 From the Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences,
 University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The authors are grateful to FAPESP and PRONEX by supporting this work.
 Stephen Fernandes Rodrigues is recipient of a scholarship from FAPESP.

Correspondence: Zuleica Bruno Fortes, PhD, Laboratory of Hypertension,
 Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University
 of São Paulo, 05508-900, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 - São Paulo,
 SP, Brazil (e-mail: zbfortes@icb.usp.br).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

Epidemiological surveys and interventional studies have revealed a higher prevalence of hypertension in the older than in younger age groups, attaining 50 to 75% in certain countries.^{5,6} This is complicated by the fact that the elderly are potentially more susceptible to other diseases like inflammatory diseases. Consequently, the combination of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) and antihypertensive agents is more frequent in those people. It is estimated that as many as 20 million patients and 12% of the elderly in the United States take concurrent NSAIDs and antihypertensive medications.^{7,8}

Association between treatment with NSAIDs (indomethacin, naproxen) and small increase in blood pressure (BP) levels has been demonstrated.^{9,10} NSAIDs may affect BP via alterations in sodium and water retention in kidneys, blockade of prostaglandin generation, mainly PGE₂ and PGI₂ (important vasodilators at renal vascular bed), and production of vasoconstricting factors, including endothelin-1 and P450-mediated metabolites of arachidonic acid.⁸ Moreover, it was found that NSAIDs affect BP most notably in hypertensive patients on antihypertensive medication.⁸ However, there are few studies on the influence of antihypertensive agents on the antiinflammatory activity of NSAIDs. We have demonstrated that drugs like enalapril and losartan, antihypertensive agents widely used, are able to reduce the antimigratory activity of diclofenac.^{11,12}

Leukocyte extravasation is fundamental in the inflammatory response and can be divided into 3 steps: initial interaction of leukocytes with activated endothelium (rolling), leukocyte activation with firm adhesion to endothelial cells (adherence), and their extravasation into the surrounding tissues (migration).¹³

Some essential steps of the inflammatory process are regulated by the presence of calcium as the leukocyte paracellular migration.¹⁴ This process involves cell adhesion molecules (CAMs) that participate directly on it and are found both in leukocytes and endothelial cells. E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1, among other adhesion molecules are involved in the interaction between leukocyte and vascular endothelial cells.^{13,15} Thus, the utilization of antihypertensive drugs, which act by blocking calcium channels, might affect the leukocyte transmigration.

Among the calcium blockers employed in clinical practice, amlodipine has been largely prescribed for the control of BP in the elderly because it has few side effects.¹⁶

Besides, it was demonstrated that amlodipine is able to inhibit the expression of CAMs like intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and E-selectin in endothelial cells in culture,¹⁷ and it reduces monocyte transmigration in vitro.¹⁸ However, to our knowledge, the effect of amlodipine on leukocyte migration has not yet been demonstrated in vivo and is therefore one of the objectives of the present study.

Parallel to inhibition of prostaglandins and thromboxanes, it was demonstrated that some NSAIDs like diclofenac are able to reduce the neutrophil rolling, adherence, and transmigration through endothelial layer by reducing the expression of CAMs (L-selectin, E-selectin, P-selectin, CD11/CD18, ICAM-1, and VCAM-1).^{11,12,19,20} Since amlodipine is an antihypertensive agent frequently employed to treat high BP and diclofenac is an antiinflammatory drug that is commonly used to treat skeletal/muscle disorders, we aim to study a possible interaction of amlodipine and diclofenac in SHR because both drugs influence the leukocyte transmigration and the expression of CAMs.

METHODS

Animals

Male SHR (age, 14 weeks; body weight, 230 to 290 g) from our own breeding colony at the Institute were used. SHR were randomized into 4 groups that were age-matched and weight-matched. The groups consisted of SHR treated with vehicle (saline solution at 0.9%, PO), SHR treated with diclofenac potassium salt Cataflan (Geigy, Sao Paulo, Brazil) at 1.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 15 d, PO], SHR treated with amlodipine [Norvasc (Pfizer, Sao Paulo, Brazil) at 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 15 d, PO], and SHR treated with diclofenac (1.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 15 d, PO) in association with amlodipine (10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ for 15 d, PO). The selection of the dose of diclofenac was based on studies performed by the manufacturer²¹ and in our previous works.^{11,12} The doses chosen in this study have previously been shown to reduce leukocyte migration (diclofenac)¹¹ and reduce BP levels in SHR (amlodipine 10 mg·kg⁻¹).²² Although the *t*_{1/2} of diclofenac might be too short, we still could find the antiinflammatory effect 24 h after the last administration of once-a-day treatments. All animal procedures were in accordance with Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (under the protocol number 007/2004).

Body Weight Gain

Body weight gain was determined before the beginning of the treatments and weekly during the 15 d of treatment of SHR.

Arterial Blood Pressure

BP levels were determined before the beginning of the treatments and after 15 d of treatment of SHR. BP was measured in unanesthetized SHR by tail plethysmography using the Powerlab/4S system (ADInstruments Ltd., Castle Hill, Australia). SHR were placed in a warming chamber maintained at 40°C for about 10 min to allow pulses to be recorded. The cuff pressure was controlled, and the systolic

pulses were detected. The average of 3 successive measurements was taken as the mean of systolic pressure values.

Direct Vital Microscopy of the Microcirculation

Surgical Preparation

The experimental preparations used in this study were similar to that described previously.^{11,12,23} Male SHR were anesthetized with an IP injection of 45 mg·kg⁻¹ sodium pentobarbital (Cristalia, Sao Paulo, Brazil), and the internal spermatic fascia of the wall of the scrotal chamber was exteriorized for microscopic examination in situ. This procedure does not require extensive surgical manipulation for the observation of the vascular network and provides a valuable mean for transilluminating a tissue for quantitative studies of the microcirculation. In addition, the preparation is not affected by respiratory movements of the rat, and its microcirculatory characteristics remain basically invariant throughout the course of the experiment. SHR were maintained on a special board thermostatically controlled at 37°C that included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was washed with warmed (37°C) Ringer-Locke solution, pH 7.4, containing 1% gelatin. The composition of the Ringer-Locke solution (in mmol/L) was 154.0 NaCl, 5.6 KCl, 2.0 CaCl₂, 2 H₂O, 6.0 NaHCO₃ and 5.0 glucose (Merck S/A, Rio de Janeiro, Brazil). A transparent plastic film was arranged on the tissue to keep it moist during the stabilization time, which lasted 30 min. A television camera was incorporated into a trinocular microscope to facilitate observation of the enlarged image (×2500) on the video screen. Images were recorded on a video recorder with a ×40 longitudinal distance objective with 0.65 numerical aperture. Measurements of the vessel diameter were realized through an image-shearing monitor incorporated in the system. Vessels selected for study were postcapillary venules, and their diameters ranged from 14 to 18 μm (second-order venules).

Experimental Protocols

Leukocyte Rolling

In a series of experiments, leukocytes moving in the periphery of the axial stream in contact with the endothelium were considered to be “rollers”²⁴ and their number was determined 30 min after surgery (stabilization time) and expressed as “rollers”/min without any stimulus except that induced by the “exposure trauma.” In these circumstances, only few adherent and migrated leukocytes are observed. The rolling leukocytes moved sufficiently slowly to be individually visible and were counted as they rolled past a 100-μm venule. The rats used in these experiments were not used for any other procedure.

TNFα-Induced Leukocyte Adhesion and Transmigration

In another series of experiments, the number of adherent (number per 100-μm length of venule) and migrated (number that accumulated in a 2500-μm² standard area of connective tissue adjacent to a postcapillary venule) leukocytes was determined after 2 h from the injection of tumor necrosis factor α (TNFα 5 ng, 0.1 ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, SC)

into the scrotum. The scrotum was opened 1.5 h after the TNF α injection, and the internal spermatic fascia was prepared for intravital microscopy analysis, which occurred 0.5 h later. Three different fields were evaluated for each animal to avoid variability based on sampling. Data were then averaged for each animal. The rats used in these experiments were not used for any other procedure.

Venular Blood Flow Velocity, Venular Shear Rate, and Leukocyte Velocity

In another series of experiments, centerline velocity of red blood cells (VRBC) was measured using an optical Doppler velocimeter that was calibrated against a rotating glass disk coated with red blood cells. The measurements were made after the stabilization period (30 min after the induction of anesthesia at basal conditions). For microvessels smaller than 25 μm , $V_{\text{RBC}} = V_{\text{mean}}$. Venular shear rates (γ) were calculated from the Newtonian definition: $\gamma = 8 (V_{\text{mean}}/D_v)$ where D_v = venule diameter.²⁵ Vessels selected for study were postcapillary venules of internal spermatic fascia, and their diameters ranged from 14 to 18 μm (second-order venules).

Leukocyte Count

Blood samples for leukocyte count were collected from the tail of unanesthetized rats immediately before the real-time PCR protocol for the detection of ICAM-1 mRNA. SHRs were placed in a hold chamber, and their tails were warmed at 40°C for about 30 s to facilitate the blood collect. Blood was placed into tubes containing EDTA (Labor Vacuum, Sao Paulo, Brazil). Total leukocyte count was made after erythrocyte lyses with Cellmilise II solution (CELM, Sao Paulo, Brazil) in automatic counter (CELM CC-530, CELM, Sao Paulo, Brazil). Stained blood films were used for differential leukocyte counts.

Determination of Plasma Concentrations of Diclofenac and Amlodipine

Approximately 500 μL of blood were obtained from the orbital sinus before (blank samples) and after 15 min, 45 min, 6 h, and 24 h of the initial oral administration of diclofenac potassium salt (1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to SHR, SHR treated with amlodipine (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and SHR treated with diclofenac (1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in association with amlodipine (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The three first times were chosen to incorporate the peak plasmatic concentration of both drugs investigated, according to the literature^{26,27} and to previous tests performed by us. The 24-hour time was chosen because all the experimental procedures were run at this time interval. The blood was collected into heparinized tubes. The samples were subsequently centrifuged (1500 $\text{rev}\cdot\text{min}^{-1}$ for 10 min at 4°C), and plasma was stored at -20°C for further utilization. Plasma concentrations of diclofenac and amlodipine were analyzed by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry according to Oliveira et al.²⁸ and Padua et al.²⁹ All frozen plasma samples were previously thawed at room temperature and centrifuged (3000 $\text{rev}\cdot\text{min}^{-1}$ for 5 min at 4°C) to precipitate solids. The analyte and internal standard [diclofenac potassium (Medley Indústria Farmacêutica, Sao Paulo, Brazil) and felodipine (Astra-Zeneca, Sao Paulo, Brazil)] were extracted

from the plasma samples (150 μL) by liquid-liquid extraction using diethylether dichloromethane (60/40, vol/vol) and chromatographed on a C18 analytic column (Alltech, Prevail, C18; 3 μm ; 100 $\times$ 4.6 mm). The mobile phase consisted of 2 solutions: (1) acetonitrile-water mixture (95/5, vol/vol) plus 5 mM ammonium formate and 10 mM formic acid; (2) water plus 5 mM ammonium formate and 10 mM formic acid. The method has a chromatographic total run time of 4.5 min. Detection was carried out on a Micromass triple quadrupole tandem mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) by multiple reaction monitoring. Acetonitrile (HPLC grade), dichloromethane, and diethylether (analytic grade) were purchased from Mallinckrodt (St Louis, MO). Formic acid (analytic grade) was purchased from Merck (Rio de Janeiro, Brazil). Ultrapure water was obtained from an Elga UHQ ultrafiltration system (Elga, UK). The results represent plasma concentration curve of the drugs relative to the time and area under curve (AUC) values. The rats used in these experiments were not used for any other procedure.

Immunohistochemistry Analysis for Detection of ICAM-1, P-Selectin, and PECAM-1

Cross-sections of the unstimulated whole testis of SHR were prepared for the avidin-biotin/diaminobenzidine immunoperoxidase detection of ICAM-1, P-selectin, and PECAM-1 on the endothelium of venules of the internal spermatic fascia. Under anesthesia with pentobarbital sodium (45 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, IP), testis were excised through a longitudinal incision of the skin and dartos muscle in the midline over the ventral aspect of the scrotum. Specimens were then quick-frozen in hexane (Synth, Sao Paulo, Brazil). Sections of 8- μm thickness were cut on a Leica CM 1850 cryostat (Heidelberg, Germany) at -25°C and collected on glass slides previously coated with a thin layer of poly-L-lysine solution (Sigma, St. Louis, MO). Slides were incubated in acetone at -20°C for 10 min and stored in a freezer at -20°C for further utilization. Sections were washed once in 0.1 M PBS for 5 min and then incubated with biotin-conjugated monoclonal anti-rat ICAM-1 (CD54) antibody, clone 1A29, mouse IgG1 (1:10 in 0.1 M PBS plus Tween 20 0.3% solution; BD Pharmingen, San Diego, CA), biotin-conjugated monoclonal anti-rat PECAM-1 (CD31) antibody, clone TLD-3A12, mouse IgG1 (1:1000 in 0.1 M PBS plus Tween 20 0.3% solution; BD Pharmingen), or purified rabbit polyclonal anti-human P-selectin (CD62P) antibody (1:100 in 0.1 M PBS plus Tween 20 0.3% solution plus 5.0% rabbit serum; BD Pharmingen) overnight at 4°C. Slides were rinsed 3 times in 0.1 M PBS for 10 min each. Negative control sections were treated in the same manner as the experimental slides, except that the primary antibody was replaced by PBS 0.1 M. The slides incubated with anti-human polyclonal P-selectin antibody were afterwards incubated with biotin-conjugated secondary IgG anti-rabbit antibody (1:1000 in 0.1 M PBS plus Tween 20 0.3% solution; Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h at room temperature and washed 3 times in 0.1 M PBS 0.1. Cross-sections were subsequently incubated with biotin-streptavidin solution (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h at room temperature before 2 rinses in 0.1 M PBS (5 min each). Slides were incubated in

TABLE 1. Body Weight Gain From 14th to 16th Week of Age and Tail Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats Treated With Vehicle, Diclofenac, Amlodipine, and Diclofenac + Amlodipine

Groups	Body Weight Gain (g)	Blood Pressure (mm Hg)	
		Initial	15th day
Vehicle	14.3 ± 1.9 (10)	177.9 ± 3.2 (12)	183.1 ± 4.4 (12)
Diclofenac (1 mg·kg ⁻¹)	13.7 ± 2.2 (12)	176.7 ± 2.4 (10)	180.0 ± 2.3 (10)
Amlodipine (10 mg·kg ⁻¹)	7.9 ± 4.4 (07)	187.0 ± 3.6 (11)	156.3 ± 4.3† (11)
Diclofenac (1 mg·kg ⁻¹) + Amlodipine (10 mg·kg ⁻¹)	10.5 ± 3.0 (12)	183.8 ± 2.8 (10)	160.8 ± 5.0*‡ (08)

Values are means ± SEM.
The numbers of rats used are reported in parentheses.
**P* < 0.01.
†*P* < 0.001 vs V.
‡*P* < 0.05 vs D.

diaminobenzidine solution (0.5 mg·mL⁻¹ in 0.1 M PBS) in the presence of hydrogen peroxide (0.6 μL·mL⁻¹ in 0.1 M PBS; Synth, Sao Paulo, Brazil) and afterwards washed twice in 0.1 M PBS and once in distilled water. Slides received Microscopy Entellan New mounting medium (Merck, Darmstadt, Germany) and were covered with cover glasses. Stain on the venular endothelial cells of the internal spermatic fascia was evaluated on an Axioskop 50 optical microscopy (Carl Zeiss, Gottingen, Germany) and analyzed by the software KS 300 3.0 (Zeiss, Germany). The results are expressed in arbitrary units.

Real-Time PCR for Detection of ICAM-1 mRNA

In another series of experiments, unstimulated spermatic fascias were dissected from pentobarbital sodium-anesthetized (45 mg·kg⁻¹, IP) SHR treated with vehicle, diclofenac, amlodipine, or diclofenac plus amlodipine, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C. Total cellular RNA was isolated from the spermatic fascia using TRizol Reagent (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's instruction. DNase I was employed to digest DNA to obtain RNA

purification before RT reaction. Total RNA (2 μg) was used for first-strand cDNA synthesis [reverse transcriptase (RT)] using SuperScript II (Invitrogen), and RNaseOUT (Invitrogen) was also added to protect the RNA during this process. Amplification was performed by using of the following primers: 5'- CCT CTT GCG AAG ACG AGA AC - 3' (forward) and 5'- ACT CGC TCT GGG AAC GAA TA - 3' (reverse) (198 pb) for rat ICAM-1 and 5'- AAG ATT TGG CAC CAC ACT TTC TAC A - 3' (forward) and 5'- CGG TGA GCA GCA CAG GGT - 3' (reverse) for rat β-actin. The level of cDNA was analyzed by quantitative real-time PCR using Platinum SYBR green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). Real-time PCR reactions were performed, recorded, and analyzed by using Corbett Research system (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). PCR conditions used to amplify all genes were 2 min at 95°C and 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 20 s. Specificity of the SYBR green assays was confirmed by melting-point analysis. Expression data were calculated from the cycle threshold (Ct) value using the ΔCt method for quantification.³⁰ Gene expression of the β-actin mRNA was used for normalization. The results were expressed in fold increase.

Flow Cytometry for Detection of L-selectin and CD-18

To evaluate the effect of the different treatments on CD18 and L-selectin protein expressions, leukocytes from SHR were isolated from blood (6 mL) collected from the abdominal aorta under anesthesia (pentobarbital sodium 45 mg·kg⁻¹, IP). Blood was initially placed into tubes containing EDTA (Labor Vacuum, Sao Paulo, Brazil). Erythrocyte lysis was subsequently performed using 0.13 M ammonium chloride solution (1:7, blood:ammonium chloride solution, vol/vol) for 5 min at 4°C, and a pellet of leukocytes was obtained after centrifugation (1200 rev·min⁻¹, 5 min at 4°C) and discard of supernatant. Leukocytes were resuspended in 1 ml of HBSS (pH = 7.4) whose composition (in mmol/L) was 137.0 NaCl, 5.4 KCl, 0.7 Na₂HPO₄, 0.7 KH₂PO₄ e 5.5 glucose (Merck and Synth) plus 27.5 mM Tris base and 0.1% bovine serum albumine (BSA) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO) and counted in Neubauer chamber. Samples were centrifuged (1200 rev·min⁻¹, 10 min at 4°C) and resuspended in HBSS plus Tris and BSA in a final concentration equal to 11.11 × 10⁶

TABLE 2. Venular Diameter, Number of Rollers, and Adherent and Migrated Leukocytes 2 Hours After Tumor Necrosis factor-alpha in Spontaneously Hypertensive Rats Treated With Vehicle, Diclofenac, Amlodipine, and Diclofenac + Amlodipine

Groups	Venular Diameter (μm)	Rollers (in 10 min)	Adherent Leukocytes (in 100 μm of Venular Length)	Migrated Leukocytes (in An Area of 2500 μm ²)
Vehicle	16.4 ± 0.5 (08)	81.1 ± 3.4 (07)	9.8 ± 0.8 (08)	8.2 ± 0.7 (09)
Diclofenac (1 mg·kg ⁻¹)	17.9 ± 0.6 (08)	35.5 ± 3.4‡ (08)	3.3 ± 1.0‡ (07)	1.7 ± 0.4‡ (07)
Amlodipine (10 mg·kg ⁻¹)	18.3 ± 0.4 (08)	67.0 ± 6.2 (07)	5.1 ± 0.6† (07)	4.4 ± 0.4‡ (07)
Diclofenac (1 mg·kg ⁻¹) + Amlodipine (10 mg·kg ⁻¹)	17.2 ± 0.2 (06)	54.6 ± 10.7* (07)	6.6 ± 0.7*§ (07)	6.0 ± 0.6*¶ (08)

Values are means ± SEM.
In parenthesis is the number of rats used. TNF-alpha, tumour necrosis factor-alpha.
**P* < 0.05.
†*P* < 0.01.
‡*P* < 0.001 versus V.
§*P* < 0.05.
¶*P* < 0.001 versus D.

leukocytes/ml. Volume equal a 90 μL , equivalent to 1×10^6 cells, was incubated with or without primary antibody for 30 min at 4°C in the dark with antibody against CD18 (conjugated with 5.5 mg/L FITC; BD Pharmingen) or L-selectin (conjugated with 26 mg/L FITC, BD Pharmingen). As negative control, leukocytes were treated in the same manner as those obtained from experimental group rats, except that antibodies were not added. After incubation, cells were washed, resuspended in 500 μL of HBSS plus Tris and BSA, and the fluorescence was determined on an automated fluorescence-associated cell-separation system (FACS Calibur, BD). Cell-Quest software (BD) was used to quantify the results. Granulocytes were separated in a gate by their higher size and granularity. Data were obtained from 5000 granulocytes. Results are expressed in intensity of fluorescence (arbitrary units $\pm$ SEM, $n = 4$ to 8).

Statistical Analyses

Data are given as means $\pm$ SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey Multiple Comparison Test were used, except for the comparison of the plasma concentrations of the drugs when unpaired Student *t* test was used. The minimum acceptable level of significance was *P* at a value less than or equal to 0.05.

RESULTS

Body Weight Gain

T1 The treatments tested did not interfere with the body weight gain in SHR (Table 1).

Arterial Blood Pressure

Diclofenac treatment did not change the BP levels of SHR, but amlodipine, combined or not with diclofenac, decreased the BP values compared to the vehicle-treated group (Table 1).

Direct Vital Microscopy of the Microcirculation

T2 Venular diameters were not changed by any treatment tested in SHR (Table 2).

Diclofenac decreased the number of rollers in SHR, and its association with amlodipine did not interfere significantly with that reduction (Table 2). On the other hand, amlodipine did not change the leukocyte rolling compared to vehicle-treated SHR (Table 2). Both diclofenac and amlodipine reduced the number of adherent and migrated leukocytes of SHR after previous stimuli (2 hours) with $\text{TNF}\alpha$; however, when administered combined, amlodipine decreased the effect of the diclofenac on the number of adherent and migrated leukocytes (Table 2).

Venular Blood Flow Velocity, Venular Shear Rate, and Leukocyte Velocity

F1 Compared to vehicle-treatment, no tested treatment modified the venular blood flow velocity, venular shear rate, and leukocyte velocity of SHR (Figure 1).

Leukocyte Count

There was no significant difference between the treatments with diclofenac, amlodipine, or diclofenac associated

FIGURE 1. Bar graphs representing the venular blood flow velocity in $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (upper), venular shear rate in s^{-1} (middle), and leukocyte velocity in $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (bottom) determined in unstimulated venules of the internal spermatic fascia of vehicle-treated (V), diclofenac-treated (D; $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), amlodipine-treated (A; $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and diclofenac+amlodipine-treated (D+A; $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively) spontaneously hypertensive rats (SHR). Number into the bars refers to the number of animals used. Values are means $\pm$ SEM.

with amlodipine on the total or differential leukocyte countings in SHR (Figure 2).

Plasma Concentrations of Diclofenac and Amlodipine

F3 The plasma concentration of diclofenac was not modified by amlodipine (Figure 3, A and B). Similarly, the plasma

FIGURE 2. Bar graphs representing the total and differential leukocyte count per μl of blood collected from tail of unstimulated-unanesthetized spontaneously hypertensive rats treated with vehicle (V), diclofenac (D; $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), amlodipine (A; $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), or diclofenac+amlodipine (D+A; $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively). Number in parenthesis refers to the number of animals used. Values are means $\pm$ SEM.

concentration of amlodipine was not changed by diclofenac (Figure 3, C and D).

Immunohistochemistry Analysis for Detection of ICAM-1, P-Selectin, and PECAM-1

Treatment of SHR with diclofenac and amlodipine, administered alone, decreased the protein expression of ICAM-1 in venular endothelial cells. However, when diclofenac and amlodipine were administered combined, the ICAM-1

expression was similar to the vehicle-treated group (Figures 4, A and B). No treatment altered the expression of P-selectin (Figure 5, A and B) or PECAM-1 (Figure 6, A and B) in venular endothelial cells of SHR. [F4] [F5] [F6]

Real-Time PCR of ICAM-1 mRNA

Treatment of SHR with diclofenac and amlodipine, administered alone, decreased the ICAM-1 mRNA in venular endothelial cells. However, when diclofenac and amlodipine

FIGURE 3. A, Plasma concentration-time curves after oral administration of diclofenac ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) associated or not with amlodipine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to spontaneously hypertensive rats (SHR). B, Bars representing the area under the plasma concentration-time curves (AUC) after oral administration of diclofenac ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) associated or not with amlodipine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to SHR. C, Plasma concentration time curves after oral administration of amlodipine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) associated or not with diclofenac ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to SHR. D, Bars representing the area under the plasma concentration-time curves (AUC) after oral administration of amlodipine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) associated or not with diclofenac ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to SHR. Values are means $\pm$ SEM. Number into the bars refers to the number of animals used.

FIGURE 4. A, Bar graphs representing the ICAM-1 expression in arbitrary units in unstimulated venules of the internal spermatic fascia of spontaneously hypertensive rats treated with vehicle (V), diclofenac (D; $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), amlodipine (A; $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and diclofenac+amlodipine (D+A; $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). As negative controls (NC; white bar), preparations that were not treated with the monoclonal antibody were tested. The results were obtained after analysis by the software KS300. Number into the bars refers to the number of animals used. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus NC; ## $P < 0.01$ versus V. Values are means $\pm$ SEM. B, Representative microphotographs showing the intensity of the avidin-biotin-diaminobenzidine complex. Bar, $25 \mu\text{m}$.

were administered combined, the ICAM-1 expression was similar to that observed in SHR treated with the vehicle (Figure 7).

Flow Cytometry for Detection of L-selectin and CD-18

SHR treated with diclofenac, amlodipine, or the combination of both had no difference on the L-selectin

(Figure 8) and CD-18 (Figure 9) expressions on granulocytes compared to vehicle-treated SHR.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated for the first time that amlodipine reduces *in vivo* leukocyte migration in SHR, interfering with ICAM-1 protein and gene expression. We also found that amlodipine reduces the effect of diclofenac on

FIGURE 5. A, Bar graphs representing the P-selectin expression in arbitrary units in unstimulated venules of the internal spermatic fascia of spontaneously hypertensive rats treated with vehicle (V), diclofenac (D; $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), amlodipine (A; $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and diclofenac+amlodipine (D+A; $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). As negative controls (NC; white bar), preparations that were not treated with the monoclonal antibody were tested. The results were obtained after analysis by the software KS300. Number into the bars refers to the number of animals used. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus NC. Values are means $\pm$ SEM. B, Representative microphotographs showing the intensity of avidin-biotin diaminobenzidine complex. Bar, $40 \mu\text{m}$.

leukocyte transmigration in this model of hypertension. A pharmacokinetic drug interaction could explain our results; however, this possibility was discarded because no significant difference was found in plasma concentrations of the drugs given alone or in association.

NSAIDs have been widely used for treatment of several acute and chronic inflammatory diseases. They act mainly by blocking the action of the cyclooxygenase enzyme, and they

consequently inhibit the synthesis of prostaglandins. Prostaglandins not only participate actively in the inflammatory process, but they also have important physiological roles such as in gastric protection.

Amlodipine is an antihypertensive drug that belongs to the L type-calcium channel blockers and is widely used for the control of high BP. When administered at the dose of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, amlodipine reduced BP levels in SHR

FIGURE 6. A, Bar graphs representing the PECAM-1 expression in arbitrary units in unstimulated venules of the internal spermatic fascia of spontaneously hypertensive rats treated with vehicle (V), diclofenac (D; 1 mg·kg⁻¹), amlodipine (A; 10 mg·kg⁻¹), and diclofenac+amlodipine (D+A; 1 mg·kg⁻¹ and 10 mg·kg⁻¹). As negative controls (NC; white bar), preparations that were not treated with the monoclonal antibody were tested. The results were obtained after analysis by the software KS300. Number into the bars refers to the number of animals used. ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 versus NC. Values are means ± SEM. B, Representative microphotographs showing the intensity of avidin-biotin diaminobenzidine complex. Bar, 40 μm.

(approximately 30 mm Hg), similarly to that observed by Yokota et al.²²

NSAIDs (for example, indomethacin and naproxen) are known to attenuate the effects of some antihypertensive agents.^{7,31} However, this is not a universal finding; diclofenac did not interfere with the BP-lowering effect of other antihypertensive drugs such as β-blockers,³² enalapril,¹¹ and losartan.¹² In fact, diclofenac did not interfere with either the

BP of SHR or with the BP-lowering effect of amlodipine in the present study. This may be the consequence of the low dose of diclofenac used. In fact, Whelton³³ demonstrated that diclofenac has a dose-dependent effect on BP; as we found, no effect would therefore be observed at low dose.

To investigate leukocyte endothelial interactions in the present study, we chose postcapillary venules in because they are considered to be the major site for leukocyte adhesion

FIGURE 7. Bar graphs represent the relative mRNA for ICAM-1 expression in unstimulated venules of the internal spermatic fascia of spontaneously hypertensive rats treated with vehicle (V), diclofenac (D; 1 mg·kg⁻¹), amlodipine (A; 10 mg·kg⁻¹), and diclofenac+amlodipine (D+A; 1 mg·kg⁻¹ and 10 mg·kg⁻¹) obtained by real-time PCR. Number into the bars refers to the number of animals used. **P* < 0.05 versus V. Values are means $\pm$ SEM.

to the vascular wall in response to noxious stimuli.²³ With intravital microscopy, leukocyte behavior can be dissected into the 3 main steps: rolling, adherence, and transmigration.

Rolling behavior can be studied without any stimulus except that induced by exposure trauma and was used in our study. Amlodipine did not interfere with rolling leukocytes nor alter the reduction of this parameter observed after diclofenac treatment.

Because a large number of mediators has been implicated in the leukocyte-endothelium interaction leading to adhesion and leukocyte transmigration during inflammation, the experimental strategy we employed to assess the contribution of specific mediators to this facet of the response

involved exposure of venules to an exogenous irritant such as TNF α . This mediator is able to induce venular endothelial cells to synthesize CAMs like ICAM-1, facilitating the interaction endothelial cell-leukocyte.³⁴ Furthermore, it is highly chemotactic for neutrophils.³⁵ In this case, neutrophils are therefore most likely responsible for the leukocyte response seen in our study. We chose 2-hour time exposure of TNF α because it is the minimum time to observe adherence and transmigration. The reduction in leukocyte adherence and migration after the combination was not different from that observed with amlodipine alone, but it was of a lower magnitude than that observed with diclofenac; therefore, we may conclude that amlodipine reduced the effect of diclofenac but that diclofenac did not interfere with the effect of amlodipine.

Whether reduction of the BP levels caused by amlodipine participates in reducing leukocyte adherence and migration in vivo in SHR is unknown; however, Singhal et al¹⁸ observed that amlodipine reduces monocyte migration in vitro independently of its pressure-lowering effect. This observation supports the idea that effects other than BP reduction, such as antioxidant property, that are present in some antihypertensive drugs like amlodipine can contribute in a more important way to the antimigratory effect of that drug.

Besides the influence of CAMs on the leukocyte-endothelial interaction, the hemodynamic force represented by parameters like flow and resistance affects the transport of leukocytes to an injury site.³⁶ To evaluate the possible interference of hemodynamic changes on the leukocyte behavior studied, we measured venular diameter and venular blood flow velocity to calculate the wall shear rate because the dependence of shear rate on leukocyte adhesion has been demonstrated in vivo³⁷ and in vitro.³⁸ Low shear rates promote leukocyte adherence to microvascular endothelium in postcapillary venules.³⁷ Therefore, increase in shear rate might explain the decrease in leukocyte transmigration observed with the different treatments. However, no treatment tested increased the venular

FIGURE 8. A, Bar graphs representing the L-selectin expression in unstimulated granulocytes of spontaneously hypertensive rats treated with vehicle (V), diclofenac (D; 1 mg·kg⁻¹), amlodipine (A; 10 mg·kg⁻¹), and diclofenac+amlodipine (D+A; 1 mg·kg⁻¹ and 10 mg·kg⁻¹), obtained by flow cytometry. As negative control (NC), preparations that were not treated with the primary antibody were tested. n, number of rats used. Values are means $\pm$ SEM. B, Representative results of the experiments are shown.

FIGURE 9. A, Bar graphs representing the CD-18 expression in unstimulated granulocytes of spontaneously hypertensive rats treated with vehicle (V), diclofenac (D; 1 mg·kg⁻¹), amlodipine (A; 10 mg·kg⁻¹), and diclofenac+amlodipine (D+A; 1 mg·kg⁻¹ and 10 mg·kg⁻¹), obtained by flow cytometry. As negative control (NC), preparations that were not treated with the primary antibody were tested. n, number of rats used. Values are means $\pm$ SEM. B, Representative results of the experiments are shown.

blood flow velocity and venular shear rate. Therefore, we can exclude interference of these parameters on the alterations observed.

An alteration on the number of circulating neutrophils caused by any treatment could explain why the administration of diclofenac and amlodipine reduced leukocyte adherence and transmigration. However, we did not detect a statistically significant difference in the number of circulating leukocytes after all treatments used. Thus, an influence of this parameter on the reduced migration could be excluded.

The mechanisms underlying leukocyte accumulation in a tissue depend on the interaction between the cells and the vascular endothelium. During the development of inflammatory responses, leukocytes roll along the lining endothelium of postcapillary venules and eventually become firmly attached to the vascular wall before migrating into tissues.¹³ Specific adhesion glycoproteins expressed on the surface of leukocytes and endothelial cells play an important role in the adhesion and migrated phenomena.³⁹ It is known that both diclofenac^{19,20} and amlodipine¹⁷ are able to reduce the expression of several CAMs, thus exerting an antiinflammatory effect.

Members of the selectin family of CAMs, P-selectin expressed on endothelial cells and L-selectin or CD18 expressed on leukocytes, can mediate leukocyte rolling along the wall of the microvasculature.⁴⁰ No drug used in our study modified P-selectin and L-selectin expressions in SHR. This may explain why amlodipine did not reduce the rolling leukocytes. The mechanism involved in the reduction in the number of rollers observed by us with diclofenac associated or not with amlodipine in SHR remains unknown; however, we hypothesize that it is the consequence of the diclofenac effect on the expression of other CAMs.

Reduction in CAMs on endothelial cells or on leukocytes could also be involved in the reduced leukocyte adherence and transmigration observed. In the present study we demonstrated that the administration of diclofenac or

amlodipine reduced the ICAM-1 expression on endothelial cells of SHR. This finding might explain why both diclofenac and amlodipine reduced adherence and transmigration in SHR. In fact, reduction in ICAM-1 protein expression by diclofenac^{11,12,20} or amlodipine¹⁷ has been previously observed, but not the interference of each drug on each effect, reducing ICAM-1 expression in vivo as we demonstrated. Expression of PECAM-1 as well as of CD-18 seems not to be involved in the effect of the drugs alone or combined because no difference in the expression of these molecules was found after the treatments.

Reduction in ICAM-1 expression might be due to the reduced level of mRNA expression we found. This has been previously demonstrated by Sakai²⁰ for diclofenac and by Yoshii et al⁴¹ for amlodipine when employed alone. We confirm these findings and extended the observation showing that the effect of diclofenac on ICAM-1 mRNA is reduced when it is combined with amlodipine.

The mechanism by which TNF α increases the number of adherent and migrated leukocytes might involve activation of the transcription factor NF- κ B via NADPH activity-derived oxidant signaling, resulting in increased ICAM-1 expression.^{34,42,43} Thus, we hypothesize that diclofenac and amlodipine reduce the ICAM-1 mRNA; consequently, the protein expression of this molecule, either reducing the activity of NF- κ B or NADPH oxidant signaling. In fact, it has been demonstrated that both diclofenac⁴⁴ and amlodipine^{45,46} reduce, albeit slightly, the mRNA for NF- κ B.

Antioxidant properties of these drugs could contribute to that effect. Yoshii et al⁴¹ demonstrated that amlodipine is able to reduce NADPH expression and activity and ICAM-1 expression in apolipoprotein E-deficient (ApoEKO) mice. Reduction in lipid peroxidation,⁴⁷ free-radical-scavenging activity,⁴⁸ and inhibition of superoxide generation in rat polymorphonuclear leukocytes⁴⁹ have been described for diclofenac.

The most interesting finding of our study, the reduction of the antimigratory effect of the diclofenac when administered combined with amlodipine, may be explained by the blocking effect of amlodipine on the reduction of the ICAM-1 expression caused by diclofenac. The intimate mechanism involved in this interaction remains to be clarified.

CONCLUSION

Our data allow us to conclude that amlodipine reduces the leukocyte transmigration, interfering with ICAM-1 protein and gene expressions in SHR. Therefore, besides reducing BP levels, amlodipine may also be useful for modulation of the inflammatory process mainly characterized by leukocyte accumulation as atherosclerosis and myocardial and cerebral ischemia-reperfusion injuries.

When associated with diclofenac, amlodipine may hinder the full expression of the antiinflammatory effect of this NSAID. Thus, the use of this combination must be monitored closely in clinical practice, mainly in the elderly population, where amlodipine is widely used to reduce high BP levels. Due to the high incidence of musculoskeletal disorders, the use of antiinflammatory drugs like diclofenac is very common in this population, making the combination of both drugs not unusual.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Antonio Garcia Soares Junior for good technical assistance.

REFERENCES

- Minino AM, Smith BL. Deaths: Preliminary data for 2000. *Natl Vital Stat Rep.* 2001;49:1–40.
- Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 1997;349:1269–1276.
- He J, Whelton PK. Elevated systolic blood pressure and risk of cardiovascular and renal disease: overview of evidence from observational epidemiologic studies and randomized controlled trials. *Am Heart J.* 1999;138:S211–S219.
- Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med.* 1996;334:13–18.
- Trenkwalder P, Ruland D, Stender M, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a population over the age of 65 years: results from the Starnberg Study on Epidemiology of Parkinsonism and Hypertension in the Elderly (STEPHY). *J Hypertens.* 1994;12:709–716.
- Fagard RH, Van Den Enden M, Leeman M, et al. Survey on treatment of hypertension and implementation of World Health Organization/International Society of Hypertension risk stratification in primary care in Belgium. *J Hypertens.* 2002;7:1297–1302.
- Ruoff GE. The impact of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on hypertension: Alternative analgesics for patients at risk. *Clin Ther.* 1998;20:376–387.
- Frishman WH. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy on blood pressure and peripheral edema. *Am J Cardiol.* 2002;89:18D–25D.
- Pope JE, Anderson JJ, Felson DT. A meta-analysis of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure. *Arch Intern Med.* 1993;153:477–484.
- Johnson AG, Nguyen TV, Day RO. Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1994;121:289–300.
- Martinez LL, Oliveira MA, Miguel AS, et al. Enalapril interferes with the effect of diclofenac on leukocyte-endothelium interaction in hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;42:258–265.
- Martinez LL, Oliveira MA, Miguel AS, et al. Losartan attenuates the antimigratory effect of diclofenac in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46:190–199.
- Butcher EC. Leukocyte endothelial cell migration: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 1991;67:1033–1036.
- Hordijk PL. Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *FEBS J.* 2006;273:4408–4415.
- Ulrich H, Eriksson EE, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2003;24:640–647.
- Lydtin H, Trenkwalder P. Pharmacological effects of calcium antagonists - cardiovascular system. In: Lydtin H, Trenkwalder P, eds. *Calcium-Antagonists. A Critical Review.* Heidelberg: Springer; 1990:29–52.
- Cominacini L, Pasini AF, Pastorino AM, et al. Comparative effects of different dihydropyridines on the expression of adhesion molecules induced by TNF-alpha on endothelial cells. *J Hypertens.* 1999;17:1837–1841.
- Singhal PC, Sagar P, Gupta S, et al. Pressure modulates monocyte migration. *Am J Hypertens.* 1997;10:1297–1301.
- Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Campanero MR, et al. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest.* 1995;95:1756–1765.
- Sakai A. Diclofenac inhibits endothelial cell adhesion molecule expression induced with lipopolysaccharide. *Life Sci.* 1996;58:2377–2387.
- Schenkelaars EJ, Singh HN, Goldberg RL, et al. Pharmacological modulation of monocytes: in vivo effects on expression and interleukin-1 production. *Agents Actions.* 1991;34:66–69.
- Yokota S, Naito Y, Yoshida H, et al. Cardioprotective effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, imidapril, and Ca²⁺ channel antagonist, amlodipine, in spontaneously hypertensive rats at established stage of hypertension. *Jpn J Pharmacol.* 1998;77:79–87.
- Fortes ZB, Farsky SP, Oliveira MA, et al. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. *Diabetes.* 1991;40:1267–1273.
- Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P, et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:3887–3891.
- Davis MJ. Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical Doppler velocimeter. *Microvasc Res.* 1987;34:223–230.
- Fujimura A, Shiga T, Ohashi K, et al. Chronopharmacology of amlodipine in rats. *Life Sci.* 1993;53:595–602.
- Lala LG, Dmello PM, Naik SR. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies on interaction of "Trikatu" with diclofenac sodium. *J Ethnopharmacol.* 2004;91:277–280.
- Oliveira CH, Barrientos-Astigarraga RE, Abib E, et al. Lansoprazole quantification in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;783:453–459.
- Padua AA, Barrientos-Astigarraga RE, Rezende VM, et al. Lisinopril quantification in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004;809:211–216.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.
- Conlin PR, Moore TJ, Swartz SL, et al. Effect of indomethacin on blood pressure lowering by captopril and losartan in hypertensive patients. *Hypertension.* 2000;36:461–465.
- Stokes GS, Brooks PM, Johnston HJ, et al. The effects of sulindac and diclofenac in essential hypertension controlled by treatment with a beta blocker and/or diuretic. *Clin Exp Hypertens.* 1991;13:1169–1178.
- Whelton A. Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. *Am J Med.* 1999;106:13S–24S.
- Collins T, Read MA, Neish AS, et al. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995;9:899–909.
- Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B, et al. Critical role of P-selectin dependent rolling in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte

- adhesion and extravascular recruitment in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2000;362:190–196.
36. Schmid-Schoenbein GW, Fung YC, Zweifach BW. Vascular endothelium-leukocyte interaction, sticking shear force in venules. *Circ Res*. 1975;36:173–184.
37. Perry MA, Granger DN. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J Clin Invest*. 1991;87:1798–1804.
38. Lawrence MB, Smith CW, Eskin SG, et al. Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood*. 1990;75:227–237.
39. Woodruff JJ, Chin YA. Lymphocyte recognition of lymph node high endothelium: adhesive interactions determining entry into lymph nodes. *Kroc Found Ser*. 1984;16:255–268.
40. Ley K, Tangelder GJ, Von Andrian UH. Modulation of leukocyte rolling in vivo. In: Granger DN, Schmid-Schoenbein GW, eds. *Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion*. New York: Oxford University Press, 1995:217–240.
41. Yoshii T, Iwai M, Li Z, et al. Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions. *Hypertens Res*. 2006;29:457–466.
42. Tham DM, Martin-McNulty B, Wang YX, et al. Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and down-regulation of PPARs. *Physiol Genomics*. 2002;11:21–30.
43. Vogel SM, Orrington-Myers J, Broman M, et al. De novo ICAM-1 synthesis in the mouse lung: model of assessment of protein expression in lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:L496–L501.
44. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappaB by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 1994;265:956–959.
45. Matsumori A, Nunokawa Y, Sasayama S. Nifedipine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB. *Life Sci*. 2000;67:2655–2661.
46. Siragy HM, Xue C, Webb RL. Beneficial effects of combined benazepril-amlodipine on cardiac nitric oxide, cGMP, and TNF-alpha production after cardiac ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47:636–642.
47. Chakraborty S, Kar SK, Roy K, et al. Exploring effects of different nonsteroidal antiinflammatory drugs on malondialdehyde profile. *Acta Pol Pharm*. 2006;63:83–88.
48. Tang YZ, Liu ZQ. Evaluation of the free-radical-scavenging activity of diclofenac acid on the free-radical-induced haemolysis of human erythrocytes. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58:625–631.
49. Yuda Y, Tanaka J, Suzuki K, et al. Inhibitory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on superoxide generation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1991;39:1075–1077.

ANEXO B – Manuscrito submetido à publicação:
“Hydralazine reduces leukocyte migration by
different mechanisms in spontaneously
hypertensive and in normotensive rats”.

Manuscript Number:

Title: Hydralazine reduces leukocyte migration by different mechanisms in spontaneously hypertensive and in normotensive rats

Article Type: Research Paper

Section/Category: Cardiovascular pharmacology

Keywords: SHR; Wistar rats; hydralazine; leukocyte migration; ICAM-1; P-selectin.

Corresponding Author: Mr Stephen Fernandes Rodrigues, MSc

Corresponding Author's Institution: University of Sao Paulo

First Author: Stephen Fernandes Rodrigues, MSc

Order of Authors: Stephen Fernandes Rodrigues, MSc; Rosangela A DosSantos, PhD; Maria A Oliveira, PhD; Antonio G Soares; Rita C Tostes, PhD; Maria H Carvalho, PhD; Zuleica B Fortes, PhD

Abstract: Besides its reducing blood pressure (BP) levels effect, hydralazine is able to reduce the production of inflammatory cytokines and reduce the expression of leukocyte adhesion molecules. Pregnancy is a state of systemic inflammation and pre-eclampsia is an excessive maternal response to pro-inflammatory stimuli. Hydralazine, an antihypertensive agent that causes direct relaxation of arterial smooth muscle, has been commonly used to treat acute severe hypertension in pregnant women, a pre-eclampsia state. Differences in leukocyte behavior and leukocyte adhesion molecule expression in SHR compared to normotensive rats have been observed. However, it remains unknown if hydralazine is able to reduce leukocyte migration in vivo in hypertension and in normotension. To test this, male SHR and Wistar rats were treated with hydralazine at a dose of 80 mg/l (in drinking water for 15 d), a dose that reduces BP of SHR and Wistar rats, and at a dose of 20 mg/l that does not reduce it in SHR. BP (by tail pletismography), the number of rollers, adherent and migrated cells (by direct vital microscopy), ICAM-1, P-selectin and PECAM-1 expressions (by immunohistochemistry) and CD-18 and L-selectin (by flow citometry) were evaluated. Hydralazine reduced leukocyte adherence and migration and ICAM-1 expression in SHR independently of the reduction of BP

levels. In Wistar rats, hydralazine reduced migration and P-selectin expression. Thus we conclude that hydralazine reduces leukocyte migration by different mechanisms reducing ICAM-1 expression in SHR and P-selectin expression in Wistar rats.

Hydralazine reduces leukocyte migration by different mechanisms in
spontaneously hypertensive and in normotensive rats

Stephen F. Rodrigues, Rosangela A. dos Santos, Maria A. de Oliveira, Antonio G.
Soares, Rita de Cássia Tostes, Maria Helena C. Carvalho and Zuleica B. Fortes

Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São
Paulo, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.

Author for correspondence: Zuleica Bruno Fortes

Laboratory of Hypertension, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical
Sciences, University of São Paulo. 05508-900, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 - São
Paulo, SP, Brazil. Phone/FAX: 55-11-3091-7317

zbfortes@icb.usp.br

Abstract

Besides its reducing blood pressure (BP) levels effect, hydralazine is able to reduce the production of inflammatory cytokines and reduce the expression of leukocyte adhesion molecules. Pregnancy is a state of systemic inflammation and pre-eclampsia is an excessive maternal response to pro-inflammatory stimuli. Hydralazine, an antihypertensive agent that causes direct relaxation of arterial smooth muscle, has been commonly used to treat acute severe hypertension in pregnant women, a pre-eclampsia state. Differences in leukocyte behavior and leukocyte adhesion molecule expression in SHR compared to normotensive rats have been observed. However, it remains unknown if hydralazine is able to reduce leukocyte migration in vivo in hypertension and in normotension. To test this, male SHR and Wistar rats were treated with hydralazine at a dose of 80 mg/l (in drinking water for 15 d), a dose that reduces BP of SHR and Wistar rats, and at a dose of 20 mg/l that does not reduce it in SHR. BP (by tail pletismography), the number of rollers, adherent and migrated cells (by direct vital microscopy), ICAM-1, P-selectin and PECAM-1 expressions (by immunohistochemistry) and CD-18 and L-selectin (by flow citometry) were evaluated. Hydralazine reduced leukocyte adherence and migration and ICAM-1 expression in SHR independently of the reduction of BP levels. In Wistar rats, hydralazine reduced migration and P-selectin expression. Thus we conclude that hydralazine reduces leukocyte migration by different mechanisms reducing ICAM-1 expression in SHR and P-selectin expression in Wistar rats.

Key words: SHR; Wistar rats; hydralazine; leukocyte migration; ICAM-1; P-selectin.

Introduction

Hydralazine, an antihypertensive agent that causes direct relaxation of arterial smooth muscle, has been commonly used to treat acute severe hypertension in pregnant women (Cunningham et al., 2001; Frias and Belfort, 2003; Vigil-De Gracia et al., 2006, 2007). These patients are at increased risk for stroke, eclampsia and pulmonary edema. Redman and Sargent (2003) have proposed that pregnancy is a state of systemic inflammation and pre-eclampsia is an excessive maternal response to pro-inflammatory stimuli. This is in agreement with the observation that reduced placental IL-10 levels (Hennessy et al., 1999), an antiinflammatory cytokine, and increased TNF-alpha and IL-6 levels, inflammatory cytokines (Conrad et al., 1998; Wang and Walsh, 1996), are present in pre-eclampsia. Damaging effect of TNF-alpha on endothelial cells can contribute to pre-eclampsia (Beckmann et al., 2004). Maternal and fetal risks are decreased by antihypertensive treatment that acutely lowers severe hypertension (Lewis, 2001; Rey et al., 1997).

Besides its reducing BP effect, hydralazine is able to reduce the production of TNF-alpha from both placental explants and peripheral blood mononuclear cells (Xu et al., 2006) and increases the production of circulating IL-10 from these cells in normal pregnancy (Xu et al., 2006).

Cell adhesion molecules are highly responsible for the process of leukocyte extravasation to the target organs during an inflammatory process (Woodruff and Chin, 1984). It was demonstrated that hydralazine is able to reduce the expression of VCAM-1, a cell adhesion molecule, in heart preparations from angiotensin II-infused rats (Neves et al., 2005). However, it remains unknown if hydralazine is

able to reduce leukocyte adhesion molecule expression and consequently leukocyte migration *in vivo* in hypertension.

Differences in leukocyte behavior and leukocyte adhesion molecule expression in SHR compared to normotensive rats have been observed. Suematsu et al. (1995) observed a lesser stimulus-elicited leukocyte rolling in SHR compared to Wistar Kyoto rats, which was associated with impairment of P-selectin and sialyl Lewis X-like carbohydrates expressions on circulating leukocytes. Blank et al. (1990) demonstrated that polymorphonuclear leukocytes from SHR move for shorter distances than those from normotensive animals. Therefore we hypothesize that hydralazine might affect differently the leukocyte behavior in SHR compared to Wistar rats.

Thus, we propose to verify if hydralazine is able to influence leukocyte migration *in vivo* both in SHR and Wistar rats and the mechanisms responsible by its effect.

Material and Methods

Animals

Male SHR and normotensive control Wistar rats (15 weeks old, 240-320 g and 270-380 g body weight, respectively) from our own breeding colony at the Institute of Biomedical Sciences were used. They were randomized into 05 groups age- and weight-matched: 1) SHR treated with hydralazine (Apresolina®, Novartis, Sao Paulo, Brazil) 20 mg/l (in drinking water, ~3.5 mg/kg/day); 2) SHR treated with hydralazine 80 mg/l (in drinking water, ~14 mg/kg/day, respectively); SHR treated with vehicle (drinking water); 4) Wistar rats treated with hydralazine 80 mg/l (in drinking water, ~14 mg/kg/day); 5) Wistar rats treated with vehicle (drinking water). Rats were treated during 15 days. The higher dose of hydralazine (~14 mg/kg/day) chosen by us in this study have previously been shown to reduce BP levels in SHR (Igase et al., 2005; You et al., 2005). A group of SHR was treated with the lower dose of hydralazine (~3.5 mg/kg/day) exclusively to verify if this drug administered in a dose which does not interfere on the BP levels in SHR is able to interfering with leukocyte adherence and migration. We chose hydralazine at ~3.5 mg/kg/day because previous tests performed in our lab demonstrated this is the highest dose which does not reduce the BP levels. All animal procedures were in accordance with Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo.

Body Weight Gain and Hydralazine Solution Consumption

Body weight gain was determined before the beginning of the treatments and weekly during the 15 days of treatment of SHR and Wistar rats. Consumption of the higher dose of hydralazine was evaluated after placing the rats in metabolic cages for 24h (from the day 11 to 12 of treatment) and compared with rats that drank only tap water. Rats were maintained three days into the metabolic cages to permit adaptation previously to the definitive measurements (from the day 8 to 11 of treatment). We used the average of liquid consumption to calculate the average dose of hydralazine administered to the rats.

Arterial Blood Pressure

BP levels were determined before the beginning of the treatments and weekly during the 15 days of treatment of SHR and normotensive control rats. BP was measured in unanesthetized rats by tail plethysmography using the Powerlab/4S system (ADInstruments Ltd., Sydney, Australia). Rats were placed in a warming chamber maintained at 40°C for about 10 min to allow pulses to be recorded. The cuff pressure was controlled and the systolic pulses were detected. The average of 3 successive measurements was taken as the mean of systolic pressure values.

Direct Vital Microscopy of the Microcirculation

Surgical Preparation

The experimental preparations used in this study were similar to that described previously (Fortes et al., 1991; Martinez et al., 2004, 2005). Male SHR and Wistar rats, treated or not with hydralazine, were anesthetized with an injection of sodium pentobarbital (Cristalia, Sao Paulo, Brazil) 45 mg/kg, i. p., and the internal

spermatic fascia of the wall of the scrotal chamber was exteriorized for microscopic examination *in situ*. This procedure does not require extensive surgical manipulation for the observation of the vascular network and provides a valuable mean for transilluminating a tissue for quantitative studies of the microcirculation. In addition, the preparation is not affected by respiratory movements of the rat and its microcirculatory characteristics remain basically invariant throughout the course of the experiment. Rats were maintained on a special board thermostatically controlled at 37°C which included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was washed with warmed (37°C) Ringer-Locke solution, pH 7.4, containing 1% gelatin. The composition of the Ringer-Locke solution (in mM) was 154.0 NaCl, 5.6 KCl, 2.0 CaCl₂·2H₂O, 6.0 NaHCO₃ and 5.0 glucose (Merck S/A, Rio de Janeiro, Brazil). A transparent plastic film was arranged on the tissue to keep it moist during the stabilization time which took 30 min. A television camera was incorporated into a trinocular microscope to facilitate observation of the enlarged image (x 2500) on the video screen. Images were recorded on a video recorder with a x40 longitudinal distance objective with 0.65 numerical aperture. Measurements of the vessel diameter were done through an image-shearing monitor incorporated in the system. Vessels selected for study were postcapillary venules, and their diameters ranged from 14 to 18 µm (second-order venules).

Experimental Protocols

Leukocyte Rolling

Leukocytes from SHR and Wistar rats, treated or not with hydralazine ~ 14 mg/kg, moving in the periphery of the axial stream in contact with the endothelium were considered to be “rollers” (Dahlen et al., 1981) and their number was determined 30 min after surgery (stabilization time) and expressed as “rollers”/min without any stimulus except that induced by the “exposure trauma”. In these circumstances only few adherent and migrated leukocytes are observed. The rolling leukocytes moved sufficiently slowly to be individually visible and were counted as they rolled past a 100- μ m length venule. The rats used in these experiments were not used for any other procedure.

Tumor Necrosis Factor α –Induced Leukocyte Adhesion and Transmigration

The number of adherent (number per 100- μ m length of venule) and migrated (number that accumulated in a 2500 μ m² standard area of connective tissue adjacent to a postcapillary venule) leukocytes from SHR, treated or not with hydralazine ~ 3.5 mg/kg or ~ 14 mg/kg, and Wistar rats, treated or not with hydralazine ~ 14 mg/kg, was determined after 2 hours from the injection of tumor necrosis factor α (TNF α 5 ng, 0.1 ml; R&D Systems, Minneapolis, USA), s. c., into the scrotum. After 1.5h from the TNF α injection the scrotum was opened, and the internal spermatic fascia was prepared for intravital microscopy analysis which occurred 0.5h after. Three different fields were evaluated for each animal to avoid variability based on sampling. Data were then averaged for each animal. The rats used in these experiments were not used for any other procedure.

Venular Blood Flow Velocity and Venular Shear Rate

Centerline velocity of red blood cells (V_{RBC}) was measured using an optical Doppler velocimeter that was calibrated against a rotating glass disk coated with red blood cells. The measurements were made after the stabilization period (30 min after the induction of anesthesia at basal conditions). For microvessels $< 25 \mu\text{m}$, $V_{RBC} = V_{\text{mean}}$. Venular shear rates (γ) were calculated from the Newtonian definition: $\gamma = 8 (V_{\text{mean}}/D_v)$ where D_v = venule diameter (Davis, 1987). Vessels selected for study were postcapillary venules of internal spermatic fascia from SHR and Wistar rats treated or not with the higher dose of hydralazine and their diameters ranged from 14 to 18 μm (second-order venules). The rats used in these experiments were not used for any other procedure.

Leukocyte Count

Blood samples for leukocyte count were collected from the tail of unanesthetized rats immediately before the Real Time PCR protocol for detection of ICAM-1 mRNA. Unstimulated SHR and Wistar rats, treated or not with the higher dose of hydralazine, were placed in a hold chamber and their tails were warmed at 40°C for about 30 s to facilitate the blood collect. Blood was placed into tubes containing EDTA (Labor Vacuum, Sao Paulo, Brazil). Total leukocyte count was made after erythrocyte lyses with Cellmilise II® solution (CELM, Sao Paulo, Brazil) in automatic counter (CELM CC-530, CELM, Sao Paulo, Brazil). Stained blood films were used for differential leukocyte counts.

Immunohistochemistry Analysis for Detection of ICAM-1, P-Selectin and PECAM-1

Cross sections of unstimulated whole testis of SHR and Wistar rats treated or not with the higher dose of hydralazine were prepared for the avidin-biotin/diaminobenzidine immunoperoxidase detection of ICAM-1, P-selectin and PECAM-1 on the endothelium of venules of the internal spermatic fascia. Under anesthesia with pentobarbital sodium (Cristalia) 45 mg/kg, i. p., the testis were excised through a longitudinal incision of the skin and dartos muscle in the midline over the ventral aspect of the scrotum. Specimens were then quick-frozen in hexane (Synth, Sao Paulo, Brazil). Sections of 8- μ m thickness were cut on a Leica CM 1850 cryostat (Heidelberg, Germany) at -25°C and collected on glass slides previously coated with a thin layer of poly-L-lysine solution (Sigma Co, St Louis, MO). The samples were fixed in acetone at -20°C for 10 min and stored in freezer at -20°C for further utilization. Sections were washed once in PBS 0.1 M (5 min) and then incubated with biotin-conjugated monoclonal anti-rat ICAM-1 (CD54) antibody, clone 1A29, mouse IgG1 (50.0 mg/l in PBS 0.1 M plus Tween 20 0.3% solution) (BD Pharmingen™, San Diego, CA), biotin-conjugated monoclonal anti-rat PECAM-1 (CD31) antibody, clone TLD-3A12, mouse IgG1 (0.5 mg/l in PBS 0.1 M plus Tween 20 0.3% solution) (BD Pharmingen™) or purified rabbit polyclonal anti-human P-selectin (CD62P) antibody (5.0 mg/l in PBS 0.1 M plus Tween 20 0.3% solution) (BD Pharmingen™) overnight at 4°C. To avoid unspecific binding from the secondary antibody, we added 5% of goat serum (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA,) to the primary P-selectin antibody solution. Slides were rinsed 3 times in PBS 0.1 M for 10 minutes each. Negative control

sections were treated in the same manner as the experimental slides except that the primary antibody was replaced by PBS 0.1 M. The slides incubated with anti-human polyclonal P-selectin antibody were afterwards incubated with biotin-conjugated secondary IgG anti-rabbit antibody (1.5 mg/l in PBS 0.1 M plus Tween 20 0.3% solution) (Vectastain ABC kit) for 1 h at room temperature and washed 3 times in PBS 0.1 M. Subsequently, cross sections were incubated with biotin-streptoavidin solution (Vectastain ABC kit) for 1 h at room temperature, followed by 2 rinses in PBS 0.1 M (5 min each). Slides were incubated in diaminobenzidine solution (0.5 mg/ml in PBS 0.1 M) in presence of hydrogen peroxide (0.6 µl/ml in PBS 0.1 M) (Synth, Sao Paulo, Brazil). Sections were washed twice in PBS 0.1 M and once in distilled water. Cross sections received Microscopy Entellan® New mounting medium (Merck, Darmstadt, Germany). Stain on the venular endothelial cells of the internal spermatic fascia was evaluated on an Axioskop 50 optical microscopy (Carls Zeiss, Germany) and analyzed by the software KS 300 3.0 (Zeiss, Germany). The results are expressed in arbitrary units.

Real-Time PCR for Detection of ICAM-1 and P-selectin mRNA

Under anesthesia with pentobarbital sodium (Cristalia) 45 mg/kg, i. p., spermatic fascias from unstimulated SHR or Wistar rats, treated or not with the higher dose of hydralazine, were dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C. Total cellular RNA was isolated from the spermatic fascia using TRizol® Reagent, according to the manufacturer's instruction. DNase I was employed to digest DNA to obtain RNA purification prior to RT reaction and the integrity of RNA was verified

by agarose gel electrophoresis. Total RNA (2 µg) was used for first-strand cDNA synthesis [reverse transcriptase (RT)] using SuperScript II, and RNaseOUT was also added to protect the RNA during this process. Three pooled RNA aliquots were routinely sham reverse transcribed (i.e. RT omitted) to ensure the absence of DNA contaminants. Diluted RT samples (1:10) were submitted to Real Time PCR amplification using Platinum® SYBR® QPCR Supermix-UDG and specific oligonucleotides for ICAM-1 (CCTCTTGCGAAGACGAGAAC; reverse: ACTCGCTCTGGGAACGAATA; 198bp) and P-selectin (forward: TAATCCCCCGCAGTGTAAG; reverse: AGGTTGGCAATGGTTCCTC; 199bp). Beta-actin was used as an internal control (forward: AAGATTTGGCACCACACTTTCTACA; reverse: CGGTGAGCAGCACAGGGT; 69 pb). Real-time PCR reactions were performed, recorded, and analyzed by using Corbett Research system (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). The conditions for PCR were as follows: 50°C - 2 min; 95°C - 2 min, followed by 30 cycles of 95°C - 15 s; 60°C - 1 min, and 72°C - 15 s. Specificity of the SYBR® green assays was confirmed by melting-point analysis. Expression data were calculated from the cycle threshold (Ct) value using the ΔC_t method for quantification (Pfaffl, 2001). Gene expression of the β -actin mRNA was used for normalization. The results were expressed in fold increase. All oligonucleotides and reagents utilized in this protocol were purchased from Invitrogen Co., San Diego, CA.

Flow Cytometry for Detection of CD18 and L-selectin

To evaluate the effect of treatment with the higher dose of hydralazine on CD18 and L-selectin protein expressions, leukocytes from SHR and normotensive Wistar rats were isolated from blood (6 mL) collected from the abdominal aorta. Initially blood was placed into tubes containing EDTA (Labor Vacuum, Sao Paulo, Brazil). Subsequently, erythrocyte lysis was performed using 0.13 M ammonium chloride solution (proportion 1:7, blood:ammonium chloride solution, v/v) for 5 min at 4°C and a pellet of leukocytes was obtained after centrifugation (1200 rpm, 5 min at 4°C) and discard of supernatant. Leukocytes were resuspended in 1 ml of HBSS (pH = 7.4) whose composition (in mM) was: 137.0 NaCl, 5.4 KCl, 0.7 Na₂HPO₄, 0.7 KH₂PO₄ e 5.5 glucose (Merck and Synth), plus 27.5 mM Tris base and 0.1% bovine serum albumine (BSA) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO), and counted in Neubauer chamber. Samples were centrifuged (1200 rpm, 10 min at 4°C) and resuspended in HBSS plus Tris and BSA in a final concentration equal to 11.11×10^6 leukocytes/ml. Volume equal a 90 µl, equivalent to 1×10^6 cells, was incubated with or without primary antibody for 30 min at 4°C in the dark with antibody against CD18 (conjugated with FITC, 5.5 mg/l, BD Pharmingen™) or L-selectin (conjugated with FITC, 26 mg/L, BD Pharmingen™). As negative control, leukocytes were treated in the same manner as those obtained from experimental group rats, except that antibodies were not added. After incubation, cells were washed, resuspended in 500 µl of HBSS plus Tris and BSA, and the fluorescence was determined on an automated fluorescence-associated cell-separation system (FACS Calibur™, BD). It was utilized the software Cell Quest (BD) to quantify the results. Granulocytes were separated in a gate by their higher size and granularity.

Data were obtained from 5,000 granulocytes. Results are expressed in intensity of fluorescence (arbitrary units $\pm$ SEM, n = 4-8).

Statistical Analysis

Data are given as means $\pm$ SEM. Student's t test or one-way analysis of variances (ANOVA) followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test were used when pertinent. The minimum acceptable level of significance was P at a value less than or equal to 0.05.

Results

Body Weight Gain and Hydralazine Solution Consumption

Treatment with hydralazine during 15 days did not interfere with the body weight gain (in g) in SHR (vehicle: 20.8 ± 1.7 , $n=12$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 17.8 ± 1.9 , $n=10$; hydralazine ~ 3.5 mg/kg: 23.3 ± 3.8 , $n=06$) or Wistar rats (vehicle: 7.1 ± 3.3 , $n=06$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 10.4 ± 2.1 , $n=08$). Besides, hydralazine solution consumption (in ml/100 g body weight) was similar to the water consumption both in SHR (water: 17.2 ± 1.9 , $n=10$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 20.8 ± 1.7 , $n=09$) and Wistar rats (water: 13.7 ± 1.3 , $n=06$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 14.2 ± 1.0 , $n=11$).

Arterial Blood Pressure

The higher dose of hydralazine reduced the BP values (in mmHg) both in SHR (before treatment: 189.9 ± 4.3 , $n=08$; after treatment: 153.2 ± 4.6 , $n=08$, $P < 0.0001$) and Wistar rats (before treatment: 123.3 ± 2.4 , $n=11$; after treatment: 112.8 ± 2.6 , $n=11$, $P < 0.05$). The lower dose of hydralazine did not reduce the BP in SHR (before treatment: 197.9 ± 3.2 , $n=07$; after treatment: 192.2 ± 2.3 , $n=07$).

Direct Vital Microscopy of the Microcirculation

Venular diameters were not changed by hydralazine treatment tested in SHR and Wistar rats (table 1). Hydralazine did not decrease the number of rollers neither in SHR nor in Wistar rats (table 1). Treatment with the higher dose of hydralazine was able to reduce the number of adherent and migrated leukocytes in SHR and the

number of migrated, but not adherent, leukocytes in Wistar rats after previous stimuli (2h) with TNF-alpha (table 1). Hydralazine at a lower dose, that did not reduce the BP levels, also decreased the number of adherent (vehicle: 13.00 ± 0.41 , $n=04$; hydralazine ~ 3.5 mg/kg: 9.20 ± 0.37 , $n=05$, $P < 0.001$) and migrated (vehicle: 12.60 ± 0.81 , $n=05$; hydralazine ~ 3.5 mg/kg: 9.25 ± 0.48 , $n=04$, $P < 0.05$) leukocytes in SHR.

Venular Blood Flow Velocity and Venular Shear Rate

Compared to vehicle-treatment, hydralazine ~ 14 mg/kg did not modify the venular blood flow velocity (in mm s^{-1}) both in SHR (vehicle: 2.2 ± 0.1 , $n=07$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 2.3 ± 0.1 , $n=08$) and Wistar rats (vehicle: 2.0 ± 0.1 , $n=06$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 2.1 ± 0.1 , $n=07$). Venular shear rate (in s^{-1}) also was not changed by hydralazine ~ 14 mg/kg both in SHR (vehicle: 1044 ± 49 , $n=06$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 1020 ± 29 , $n=08$) and Wistar rats (vehicle: 935 ± 52 , $n=07$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 953 ± 42 , $n=07$).

Leukocyte Count

Compared to vehicle treatment, hydralazine ~ 14 mg/kg did not change both the SHR leukocyte total number (per μl of blood) (vehicle: 8196 ± 733 , $n=09$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 7673 ± 444 , $n=11$) and the Wistar rats leukocyte total number (vehicle: 9584 ± 640 , $n=10$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 11540 ± 443 , $n=05$). In the same way, monocyte (vehicle: 216 ± 67 , $n=11$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 199 ± 86 , $n=11$), eosinophil (vehicle: 67 ± 19 , $n=11$; hydralazine ~ 14 mg/kg: 30 ± 13 ,

n=11, lymphocyte (vehicle: 5625 ± 491 , n=08; hydralazine ~ 14 mg/kg: 5885 ± 459 , n=11) and neutrophil (vehicle: 1746 ± 129 , n=10; hydralazine ~ 14 mg/kg: 1560 ± 110 , n=11) from SHR as well as monocyte (vehicle: 560 ± 186 , n=12; hydralazine ~ 14 mg/kg: 557 ± 88 , n=08), eosinophil (vehicle: 34 ± 34 , n=11; hydralazine ~ 14 mg/kg: 72 ± 28 , n=08), lymphocyte (vehicle: 7153 ± 359 , n=10; hydralazine ~ 14 mg/kg: 8686 ± 768 , n=05) and neutrophil (vehicle: 1905 ± 241 , n=12; hydralazine ~ 14 mg/kg: 1985 ± 228 , n=08) from Wistar rats were not modified after hydralazine ~ 14 mg/kg treatment.

Immunohistochemistry Analysis for Detection of ICAM-1, P-Selectin and PECAM-1

Treatment of SHR with hydralazine ~14 mg/kg decreased the protein expression of ICAM-1 in venular endothelial cells (figures 1A and 1D), however, did not modify the expression of P-selectin (figures 1B and 1D) and PECAM-1 (figures 1C and 1D). Hydralazine ~14 mg/kg administered to Wistar rats decreased the protein expression of P-selectin in venular endothelial cells (figures 2B and 2D), and did not alter the expression of ICAM-1 (figures 2A and 2D) and PECAM-1 (figures 2C and 2D).

Real-Time PCR of ICAM-1 and P-selectin mRNA

Treatment of SHR with hydralazine ~14 mg/kg decreased ICAM-1 mRNA (Figure 3A) and did not modify P-selectin mRNA (Figure 3B). Hydralazine ~14 mg/kg did not modify ICAM-1 mRNA levels (Figure 4A) and decreased P-selectin mRNA in Wistar normotensive rats (Figure 4B).

Flow Cytometry for Detection of CD18 and L-selectin

Hydralazine ~14 mg/kg did not modify CD18 (Figure 5A and 5C) and L-selectin expressions (Figure 5B and 5C) in SHR. In Wistar rats treated with hydralazine ~14 mg/kg no alteration of expression of CD18 (Figure 6A and 6C) and increased expression of L-selectin were observed (6B and 6C).

Discussion

In the present study we demonstrated that hydralazine is able to decrease leukocyte migration in SHR *in vivo* possibly by reducing ICAM-1 expression in venular endothelial cells, independently of the lowering effect on blood pressure levels. Besides, we demonstrated that hydralazine reduces leukocyte migration in Wistar rats reducing P-selectin expression in venular endothelial cells.

Along with the reducing blood pressure effects, some antiinflammatory properties of hydralazine have been demonstrated. In normal pregnancy, Xu et al. (2006) demonstrated that hydralazine is able to reduce the production of TNF-alpha, an inflammatory cytokine, from both placental explants and peripheral blood mononuclear cells and increases the production of circulating IL-10, an antiinflammatory cytokine, from peripheral blood mononuclear cells.

We observed that hydralazine reduced leukocyte migration both in SHR and Wistar rats. Accordingly to our knowledge, this is the first report about the antimigratory properties of hydralazine.

The mechanisms involved in the effect of hydralazine on leukocyte migration might differ between SHR and Wistar rats. Whereas in SHR, reduced expression of endothelial ICAM-1 expression might be involved, in Wistar rats reduced P-selectin might contribute to the effect of hydralazine on leukocyte migration.

The antimigratory effect of hydralazine occurred independently of the lowering effect of hydralazine on blood pressure levels in SHR, since hydralazine at dose that did not reduce blood pressure levels reduced leukocyte migration. Thus,

hydralazine seems to reduce BP levels and leukocyte migration by different mechanisms.

To investigate the mechanism involved in the antimigratory effect of hydralazine the experimental strategy we employed was to assess the contribution of specific mediators to the leukocyte-endothelium interaction that leads to adhesion and leukocyte transmigration during inflammation. TNF- α was chosen since this mediator is able to induce venular endothelial cells to synthesize CAMs like ICAM-1 facilitating the interaction endothelial cell-leukocyte (Collins et al., 1995).

The mechanism by which TNF- α increases the number of adherent and migrated leukocyte might involve activation of the transcription factor NF- κ B, via NADPH activity-derived oxidant signalling, resulting in increased ICAM-1 expression (Collins et al., 1995; Tham et al., 2002; Vogel et al., 2006). Thus, the reduction in ICAM-1 mRNA and protein expressions caused by hydralazine in SHR observed by us might be due to either its reducing activity on NF- κ B or to an interference on NADPH oxidant signalling. In fact, it has been demonstrated that hydralazine reduces NF- κ B activity in angiotensin II-infused rats (Neves et al., 2005). Besides, antioxidant properties of hydralazine might contribute to its effect. Daiber et al. (2005) demonstrated that hydralazine diminishes peroxynitrite and superoxide formation in cultured smooth muscle cells. Similarly, Leiro et al. (2004) observed that hydralazine reduces extra and intracellular reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) by inflammatory macrophages probably reducing the enzyme activity of NADPH oxidase. All these effects might contribute to reduce NF- κ B induction, and consequently explain why hydralazine reduced ICAM-1 gene and protein expressions and leukocyte migration in SHR.

In Wistar rats, but not in SHR, reduction in migration caused by hydralazine might be due to decreased P-selectin expression. In fact, Atarashi et al. (2005) observed that activation of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), a major ligand for P-selectin expressed on leukocytes, might induce intracellular signals leading to activation of CD11/CD18 and consequently increasing its avidity to bind to ICAM-1. Thus, PSGL-1 activation may increase leukocyte migration into leukocyte tissues by increasing the CD11/CD18–ICAM-1 binding. In this way, we hypothesize that reduction of P-selectin expression caused by hydralazine in Wistar rats might diminish the PSGL-1 activation maintaining CD11/CD18 in a less favorable state to bind to ICAM-1 and consequently reducing leukocyte migration.

In spite of we have observed reduction in P-selectin expression after hydralazine administration in Wistar rats we did not demonstrate any effect on leukocyte rolling as it would be initially expected. This apparent discrepancy might be explained by the increase in L-selectin expression caused by hydralazine since it was demonstrated that L- and P-selectin may collaborate to support leukocyte rolling *in vivo* when the PSGL-1–P-selectin binding is inhibited (Ridger et al., 2005). Thus, we suggest that the reduction of P-selectin expression might be counterbalanced by the concomitant increase in L-selectin expression, as a consequence the leukocyte rolling would not be altered by hydralazine treatment.

Besides the influence of CAMs on the leukocyte-endothelial interaction the hemodynamic force represented by parameters like flow and resistance affects the transport of leukocytes to an injury site (Schmid-Schoenbein et al., 1975). To evaluate the possible interference of hemodynamic changes on the leukocyte

behavior studied, we measured venular diameter and venular blood flow velocity to calculate the wall shear rate because the dependence of shear rate on leukocyte adhesion has been demonstrated *in vivo* (Perry and Granger, 1991) and *in vitro* (Lawrence et al., 1990). Low shear rates promote leukocyte adherence to microvascular endothelium in postcapillary venules (Perry and Granger, 1991). Therefore, increase in shear rate might explain the decrease in leukocyte transmigration observed with hydralazine. However, hydralazine did not increase the venular blood flow velocity and venular shear rate both in SHR and Wistar rats. Therefore, we can exclude interference of these parameters on the alterations observed.

It was demonstrated that TNF-alpha is highly chemotactic for neutrophils (Mansson et al., 2000). Therefore, neutrophils are most likely responsible for the leukocyte response seen in our study. An alteration on the number of circulating neutrophils caused by hydralazine could explain why its administration reduced the leukocyte migration. However, we did not detect statistically significant difference in the number of circulating leukocytes after hydralazine treatment both in SHR and Wistar rats. Thus, an influence of this parameter on the reduced migration could be excluded.

Our results reveal an antimigratory effect of hydralazine *in vivo* that occur both in SHR and Wistar rats but by different mechanisms. In SHR, the antimigratory effect is caused by reduction in ICAM-1 expression while in Wistar rats it seems to be caused by reduction in P-selectin expression. This antimigratory effect of hydralazine might be useful and contribute to the beneficial effect of hydralazine, where the high blood pressure occurs concomitantly with an inflammatory condition

like in acute severe hypertension in pregnant women (Beckmann et al., 2004; Conrad et al., 1998; Hennessy et al., 1999; Wang and Walsh, 1996).

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP and PRONEX. SFPR is recipient of a scholarship from FAPESP.

References

- Atarashi, K., Hirata, T., Matsumoto, M., Kanemitsu, N., Miyasaka, M., 2005. Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. *J. Immunol* 174, 1424–1432.
- Beckmann, I., Efraim, S.B., Vervoort, M., Visser, W., Wallenburg, H.C., 2004. Tumor necrosis factor-alpha in whole blood cultures of preeclamptic patients and healthy pregnant and nonpregnant women. *Hypertens. Pregnancy* 23, 319–329.
- Blank, I., Baudisch, W., Burmeister, J., Franz, U., 1990. Adhesion, migration and phagocytic behavior of blood granulocytic neutrophils from the rat and humans in essential hypertension. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 235–241.
- Borges, R., Machado, J.D., Betancor, G., Camacho, M., 2002. Pharmacological regulation of the late steps of exocytosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 971, 184–192.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., Maniatis, T., 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9, 899–909.
- Conrad, K.P., Miles, T.M., Benyo, D.F., 1998. Circulating levels of immunoreactive cytokines in women with preeclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol* 40, 102–111.
- Cunningham, F.G., Gant, N.F., Leveno, K.J., Gilstrap III, L.C., Hauth, J.C., Wenstrom, K.D., 2001. Hypertensive disorders in pregnancy. In: Cunningham, F.G., Gant, N.F., Leveno, K.J., Gilstrap III, L.C., Hauth, J.C., Wenstrom, K.D. (Eds.), *Williams Obstetrics*, 21th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 567–618.
- Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedqvist, P., Arfors, K.E., Hammarstrom, S., Lindgren, J.A., Samuelsson, B., 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte

adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3887–3891.

Daiber, A., Oelze, M., Coldewey, M., Kaiser, K., Huth, C., Schildknecht, S., Bachschmid, M., Nazirisadeh, Y., Ullrich, V., Mülsch, A., Münzel, T., Tsilimingas, N., 2005. Hydralazine is a powerful inhibitor of peroxynitrite formation as a possible explanation for its beneficial effects on prognosis in patients with congestive heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 338, 1865-1874.

Davis, M.J., 1987. Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical Doppler velocimeter. *Microvasc. Res* 34, 223–230.

Fortes, Z.B., Farsky, S.P., Oliveira, M.A., Garcia-Leme, J., 1991. Direct vital microscopic study of defective leukocyte–endothelial interaction in diabetes mellitus. *Diabetes* 40, 1267–1273.

Frias, A.E., Belfort, M.A., 2003. Post magpie: how should we be managing severe preeclampsia? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol* 15, 489–495.

Hennessy, A., Pilmore, H.L., Simmons, L.A., Painter, D.M., 1999. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J. Immunol* 163, 3491–3495.

Igase, M., Strawn, W.B., Gallagher, P.E., Geary, R.L., Ferrario, C.M., 2005. Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1–7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 289, H1013–H1019.

Lawrence, M.B., Smith, C.W., Eskin, S.G., McIntire, L.V., 1990. Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood* 75, 227–237.

Leiro, J.M., Alvarez, E., Arranz, J.A., Cano, E., Orallo, F., 2004. Antioxidant activity and inhibitory effects of hydralazine on inducible NOS/COX-2 gene and protein expression in rat peritoneal macrophages. *Int. Immunopharmacol* 4, 163–177.

Lewis, G., 2001. Why mothers die. Report on confidential inquiries into maternal deaths in the United Kingdom 1997–99. RCOG Press, London.

Machado, J.D., Gómez, J.F., Betancor, G., Camacho, M., Brioso, M.A., Borges, R., 2002. Hydralazine reduces the quantal size of secretory events by displacement of catecholamines from adrenomedullary chromaffin secretory vesicles. *Circ. Res* 91, 830–836.

Mansson, P., Zhang, X.W., Jeppsson, B., Johnell, O., Thorlacius, H., 2000. Critical role of P-selectin dependent rolling in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte adhesion and extravascular recruitment in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol* 362, 190–196.

Martinez, L.L., Oliveira, M.A., Miguel, A.S., Rastelli, V.M., Walber, J., Cruz, M.C., Tostes, R.C., Carvalho, M.H., Nigro, D., Fortes, Z.B., 2004. Enalapril interferes with the effect of diclofenac on leucocyte-endothelium interaction in hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 42, 258–265.

Martinez, L.L., Oliveira, M.A., Miguel, A.S., Rastelli, V.M., Cruz, J.W., Tostes, R.C., Carvalho, M.H., Nigro, D., Fortes, Z.B., 2005. Losartan attenuates the antimigratory effect of diclofenac in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 46, 190–199.

Neves, M.F., Amiri, F., Viridis, A., Diep, Q.N., Schiffrin, E.L., 2005. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 83, 999–1006.

Perry, M.A., Granger, D.N., 1991. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J. Clin. Invest* 87, 1798–1804.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Redman, C.W., Sargent, I.L., 2003. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response – a review. *Placenta* 24, S21–S27.

Rey, E., LeLorier, J., Burgess, E., Lange, I.R., Leduc, L., 1997. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference:3. Pharmacologic treatment of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ* 157, 1245–1254.

Ridger, V.C., Hellewell, P.G., Norman, K.E., 2005. L- and P-selectins collaborate to support leukocyte rolling in vivo when high-affinity P-selectin-P-selectin glycoprotein ligand-1 interaction is inhibited. *Am. J. Pathol* 166, 945–952.

Schmid-Schoenbein, G.W., Fung, Y.C., Zweifach, B.W., 1975. Vascular endothelium–leukocyte interaction, sticking shear force in venules. *Circ. Res* 36, 173–184.

Suematsu, M., Suzuki, H., Tamatani, T., Iigou, Y., DeLano, F.A., Miyasaka, M., Forrest, M.J., Kannagi, R., Zweifach, B.W., Ishimura, Y., Schmid-Schonbein, G.W., 1995. Impairment of selectin-mediated leukocyte adhesion to venular endothelium in spontaneously hypertensive rats. *J. Clin. Invest* 96, 2009–2016.

Tham, D.M., Martin-McNulty, B., Wang, Y.X., Wilson, D.W., Vergona, R., Sullivan, M.E., Dole, W., Rutledge, J.C., 2002. Angiotensin II is associated with activation of

NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol. Genomics* 11, 21–30.

Vigil-De Gracia, P., Lasso, M., Ruiz, E., Vega-Malek, J.C., de Mena, F.T., Lopez, J.C., or the HYL A treatment study, 2006. Severe hypertension in pregnancy: hydralazine or labetalol. A randomized clinical trial. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 128, 157–162.

Vigil-De Gracia, P., Ruiz, E., Lopez, J.C., de Jaramillo, I.A., Vega-Maleck, J.C., Pinzon, J., 2007. Management of severe hypertension in the postpartum period with intravenous hydralazine or labetalol: a randomized clinical trial. *Hypertens. Pregnancy* 26, 163–171.

Vogel, S.M., Orrington-Myers, J., Broman, M., Malik, A.B., 2006. De novo ICAM-1 synthesis in the mouse lung: model of assessment of protein expression in lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol* 291, L496–L501.

Xu, B., Makris, A., Thornton, C., Ogle, R., Horvath, J.S., Hennessy, A., 2006. Antihypertensive drugs clonidine, diazoxide, hydralazine and furosemide regulate the production of cytokines by placentas and peripheral blood mononuclear cells in normal pregnancy. *J. Hypertens* 24, 915–922.

Wang, Y., Walsh, S.W., 1996. TNF alpha concentrations and mRNA expression are increased in preeclamptic placentas. *J. Reprod. Immunol* 32, 157–169.

Woodruff, J.J., Chin, Y.A., 1984. Lymphocyte recognition of lymph node high endothelium: adhesive interactions determining entry into lymph nodes. *Kroc Found. Ser* 16, 255–268.

You, D., Loufrani, L., Baron, C., Levy, B.I., Widdop, R.E., Henrion, D., 2005. High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated

vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 111, 1006–1011.

Figure legends

Fig. 1. Bar graphs representing the ICAM-1 **(A)**, P-selectin **(B)** and PECAM-1 **(C)** expressions, in arbitrary units, in non-stimulated venules of internal spermatic fascia of vehicle (V)- and hydralazine ~14 mg/kg (H)-treated SHR. As negative controls (NC), preparations that were not treated with the primary antibody were tested. The results were obtained after analysis by the software KS300 3.0. The number into the bars refers to the number of rats used. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs NC; ### $P < 0.001$ vs V. Values are means $\pm$ SEM. **D)**

Representative microphotographs showing the intensity of the avidin-biotin-diaminobenzidine complex. Bar = 40 μ m.

Fig. 2. Bar graphs representing the ICAM-1 **(A)**, P-selectin **(B)** and PECAM-1 **(C)** expressions, in arbitrary units, in non-stimulated venules of internal spermatic fascia of vehicle (V)- and hydralazine ~14 mg/kg (H)-treated Wistar rats. As negative controls (NC), preparations that were not treated with the primary antibody were tested. The results were obtained after analysis by the software KS300 3.0. The number into the bars refers to the number of rats used. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs NC; ## $P < 0.01$ vs V. Values are means $\pm$ SEM. **D)**

Representative microphotographs showing the intensity of the avidin-biotin-diaminobenzidine complex. Bar = 40 μ m

Fig. 3. Bar graphs represent the relative mRNA for ICAM-1 **(A)** and P-selectin **(B)** expressions in non-stimulated vascular bed of the internal spermatic fascia of

vehicle (V)- and hydralazine ~14 mg/kg (H)-treated SHR, obtained by real-time PCR. The number into the bars refers to the number of rats used. ** $P < 0.01$ vs V. Values are means $\pm$ SEM.

Fig. 4. Bar graphs represent the relative mRNA for ICAM-1 (**A**) and P-selectin (**B**) expressions in non-stimulated vascular bed of the internal spermatic fascia of vehicle (V)- and hydralazine ~14 mg/kg (H)-treated Wistar rats, obtained by real-time PCR. The number into the bars refers to the number of rats used. ** $P < 0.01$ vs V. Values are means $\pm$ SEM.

Fig. 5. Bar graphs represent CD-18 (**A**) and L-selectin (**B**) expressions in non-stimulated granulocytes of vehicle (V)- and hydralazine ~14 mg/kg (H)-treated SHR, obtained by flow cytometry. As negative control (NC), preparations that were not treated with the primary antibody were tested. "n" refers to the number of rats used. Values are means $\pm$ SEM. (**C**) Representative results of the experiments are shown.

Fig. 6. Bar graphs represent CD-18 (**A**) and L-selectin (**B**) expressions in non-stimulated granulocytes of vehicle (V)- and hydralazine ~14 mg/kg (H)-treated Wistar rats, obtained by flow cytometry. As negative control (NC), preparations that were not treated with the primary antibody were tested. "n" refers to the number of rats used. * $P < 0.05$ vs V. Values are means $\pm$ SEM. (**C**) Representative results of the experiments are shown.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Table

Table 1. Venular diameter (μm), number of rollers (in 10 min), adherent (in 100 μm of venular length) and migrated (in an area of 2500 μm^2) leukocytes 2h after TNF-alpha in vehicle (V)- and hydralazine 14 mg/kg (H)-treated SHR and Wistar rats.

Groups	Venular diameter	Rollers	Adherent	Migrated
SHR				
V	16.0 $\pm$ 0.5 (07)	92.8 $\pm$ 8.2 (09)	9.1 $\pm$ 0.7 (07)	8.3 $\pm$ 0.6 (07)
H	15.5 $\pm$ 0.3 (11)	88.6 $\pm$ 9.8 (07)	5.3 $\pm$ 1.2 * (07)	2.4 $\pm$ 1.0 *** (07)
Wistar				
V	17.5 $\pm$ 0.5 (09)	92.4 $\pm$ 8.9 (09)	10.5 $\pm$ 0.6 (15)	10.5 $\pm$ 0.5 (15)
H	16.4 $\pm$ 1.0 (08)	95.5 $\pm$ 11.1 (08)	8.7 $\pm$ 0.6 (07)	7.5 $\pm$ 1.3 * (06)

Values are means $\pm$ SEM. In parenthesis is the number of rats used. TNF-alpha, tumour necrosis factor-alpha. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ vs respective V.