

**Avaliação de novas vias de disfunção endotelial
no modelo experimental de hipertensão
essencial: Ações benéficas da inibição da
fosfodiesterase-5**

Marcos André Soares Leal

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

**Doutorado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória
2019

Marcos André Soares Leal

**Avaliação de novas vias de disfunção endotelial
no modelo experimental de hipertensão
essencial: Ações benéficas da inibição da
fosfodiesterase-5**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Marcos André Soares Leal

Avaliação dos efeitos do tratamento como inibidor da fosfodiesterase-5 na resposta vascular de ratos espontaneamente hipertensos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 21 de Junho de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez – Orientador

Prof^a Dr^a Camille de Moura Balarini– UFPB

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira – PPGBIOTEC-UFES

Prof. Dr. Valério Garrone Barauna – PPGCF-UFES

Prof^a Dr^a Nazaré Souza Bissoli – PPGCF-UFES

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

RESUMO

A hipertensão arterial é uma condição associada à disfunção endotelial de pequenos e grandes vasos, acompanhada por um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), prostanoídes vasodilatadores e vasoconstritores e NO. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do sildenafil, um inibidor seletivo da fosfodiesterase-5 que aumenta a via do NO, sobre a função endotelial em aortas de Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR).

Abordagem experimental: SHR tratados com sildenafil (40 mg / kg / dia, v.o., 3 semanas) foram comparados com SHR e Wistar não tratados. A reatividade vascular foi analisada em anéis aórticos de ratos. Células progenitoras endoteliais circulantes e ânions superóxido foram mensurados por citometria de fluxo. A capacidade antioxidante total plasmática, a produção de NO e a peroxidação lipídica da aorta foram determinadas por espectrofotometria. A coloração de Picrosirius e a microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para a morfologia vascular e análise estrutural da superfície endotelial.

RESULTADOS: Em SHR tratados com sildenafil houve melhoras ,parcialmente, da resposta vasodilatadora à acetilcolina na aorta de SHR e normalização da resposta vasoconstritora à fenilefrina. Nossos experimentos com um bloqueador de NO sintase revelaram uma participação aumentada de NO, diminuição da participação do estresse oxidativo, de prostanoídes derivados de Cox-1 na dilatação e contração vascular, respectivamente, e melhora no equilíbrio entre tromboxana e prostaciclina. A função vascular melhorada em SHR tratados com sildenafil não foi afetada por SC-560 e apocinina. As respostas relaxantes ao sildenafil e 8-Br-cGMP foram normalizadas em SHR tratados com sildenafil. O sildenafil restaurou o equilíbrio pró-oxidante / antioxidante, a morfologia vascular e arquitetura endotelial.

Conclusão: O sildenafil reverte a disfunção endotelial em SHR, melhorando a contração vascular e relaxamento à fenilefrina e acetilcolina, respectivamente. O mecanismo principal dos efeitos do sildenafil consiste na redução do estresse oxidativo e dos prostanoídes da ciclooxygenase-1, melhora no balanço entre tromboxano e prostaciclina, com aumento da biodisponibilidade do NO e melhora da sinalização do GMPc / PKG. Além disso, o sildenafil melhora os danos estruturais na superfície vascular e endotelial.

Palavras-chave: Hipertensão, Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR), Sildenafil, Óxido nítrico, Prostanóides, Estresse oxidativo, Disfunção endotelial, PDE5, GMPc, Proteína quinase dependente de GMP (PKG)

ABSTRACT

Arterial hypertension is a condition associated with endothelial dysfunction of small and large vessels, accompanied by an imbalance in the production of reactive oxygen species (ROS), vasodilators and vasoconstrictors prostanooids and NO. The aim of this study was to investigate the effects of sildenafil, a selective phosphodiesterase-5 inhibitor that increase NO pathway, on endothelial function in aortas from Spontaneously Hypertensive Rats (SHR).

EXPERIMENTAL APPROACH: SHR treated with sildenafil (40 mg/kg/day, p.o., 3 weeks) were compared to untreated SHR and Wistar control rats. Vascular reactivity was measured in isolated rat aortic rings. Circulating endothelial progenitor cells and superoxide anions were measured by flow cytometry. Plasmatic total antioxidant capacity, NO production and aorta lipid peroxidation were determined by spectrophotometry. Picrosirius staining and scanning electron microscopy was used for vascular morphology and structural analysis of the endothelial surface.

KEY RESULTS: Sildenafil partially restored the vasodilator response to acetylcholine in SHR aorta and normalized the vasoconstrictor response to phenylephrine. Our experiments with a NO synthase blocker revealed an augmented participation of NO, decreased participation of oxidative stress, prostanooids Cox-1-derived in the vascular dilation and contraction, respectively, in sildenafil-treated SHR and improvement in prostacyclin thromboxane balance. The improved vascular function in sildenafil-treated SHR was unaffected by SC-560 and apocynin. The relaxant responses to sildenafil and 8-Br-cGMP were normalized in sildenafil-treated SHR. Sildenafil restored the prooxidant/antioxidant balance and the vascular morphology and endothelial architecture.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS: Sildenafil reverses endothelial dysfunction in SHR by improving vascular contraction and relaxation to phenylephrine and acetylcholine, respectively. The mains mechanism behinde sildenafil effects are reduction of the oxidative stress and cyclooxygenase-1 prostanooids, improvement in prostacyclin thromboxane balance, with an augmentation of NO bioavailability and improvement in the cGMP/PKG signaling. Also, sildenafil improves structural damage in the vascular and endothelium surface.

Keywords: Hypertension, Spontaneously Hypertensive Rats (SHR), Sildenafil, Nitric oxide, Oxidative stress, Endothelial dysfunction, PDE5, cGMP, GMP-dependent protein kinase (PKG)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo das possíveis vias bioquímicas para a produção de NO e de outras substâncias vasoativas pelo endotélio em condições fisiológicas.....24
- Figura 2.** Esquema representativo das possíveis vias bioquímicas para a produção de NO e de outras substâncias vasoativas na disfunção endotelial.....26
- Figura 3.** Vias de produção de ROS em células de mamíferos.....28
- Figura 4.** Análise do efeito do tratamento com sildenafil sobre a pressão arterial sistólica (PAS) em animais SHR.....47
- Figura 5.** O efeito do tratamento com sildenafil na vasoconstrição e vasodilatação em aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).....48
- Figura 6.** Efeito do sildenafil na biodisponibilidade de óxido nítrico de ratos espontaneamente hipertensos.....49
- Figura 7.** Contribuição do sildenafil na biodisponibilidade do óxido nítrico em SHR...50
- Figura 8.** Contribuição das espécies reativas de oxigênio derivadas da NADPH oxidase sobre a função endotelial e o efeito do sildenafil51
- Figura 9.** Efeitos do tratamento com sildenafil na capacidade antioxidante total (CAT) plasmática e na peroxidação lipídica da aorta.....52
- Figura 10.** Avaliação da produção ROS ($\cdot O_2^-$), em células de sangue total, pela intensidade de fluorescência, emitida pelo DHE por citometria de fluxo.....53
- Figura 11.** Contribuição da via do GMPc para a disfunção vascular em SHR tratados com sildenafil.....54
- Figura 12.** Contribuição da via da PKG para a disfunção vascular em SHR tratados com Sildenafil.....55

- Figura 13.** Contribuição da PKA para a disfunção vascular em SHR tratados com Sildenafil.....56
- Figura 14.** Avaliação da resposta contrátil dependente do endotélio em animais SHR, e o efeito do sildenafil57
- Figura 15.** Papel dos prostanóides derivados da Cox1/2 na resposta contrátil de animais SHR, e o efeito do sildenafil.....58
- Figura 16.** Papel dos prostanóides derivados da Cox1 na resposta contrátil de animais SHR, e o efeito do sildenafil.59
- Figura 17.** Papel dos prostanóides derivados da Cox-2 na resposta contrátil de animais SHR, e o efeito do sildenafil.60
- Figura 18.** Papel do tromboxano A2 na resposta contrátil de animais SHR, e o efeito do sildenafil..... 61
- Figura 19.** Papel do receptor de tromboxano A2 na resposta contrátil de animais SHR, e o efeito do sildenafil.....62
- Figura 20.** O efeito do tratamento com sildenafil sobre os níveis urinários de prostanoides em animais SHR, e o efeito do sildenafil.....63
- Figura 21.**Efeito do sildenafil no recrutamento de células progenitoras endoteliais circulantes em SHR.....64
- Figura 22. Avaliação da secção transversal da parede vascular**
SHR.....65
- Figura 23.** Efeito do sildenafil na arquitetura endotelial da superfície vascular de SHR.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: resposta máxima, a diferença na área sob a curva e a sensibilidade, das curvas de fenilefrina e acetilcolina.....	48
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA: Análise de variância
AOPP: Produtos da oxidação avançada de proteínas
AVC: Acidente vascular cerebral
BH4: Tetraidrobiopterina
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
CML: Célula muscular lisa
CMLV: Célula muscular lisa vascular
COX 1-2: Ciclooxigenase tipo 1 e tipo 2
 Δ AUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva
DCVs: Doenças cardiovasculares
DHE: Dihidroetídeo
DMSO: Dimetilsulfóxido
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
EPM: Erro padrão da média
FACS: Separador celular ativado por fluorescência
FAD: flavina adenina
FE: Fenilefrina
FMN: Flavina mononucleotídeo
GCs: Guanilato ciclase solúvel
GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina
HA: Hipertensão arterial
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
KCl: Cloreto de potássio
L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester
Log EC₅₀: Log da concentração de agonista que produziu metade da resposta máxima
MIF: Mediana intensidade de fluorescência
MLV: Músculo liso vascular
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
•OH⁻: Hidroxila
•O₂⁻: Ânion superóxido
•ONOO⁻: Peroxinitrito
PA: Pressão arterial
PAS: Pressão arterial sistólica
PBS: Solução tampão fosfato
PDEs: Fosfodiesterases
PGI₂: Prostaciclina
PKA: Proteína kinase A
PKC: Proteína kinase C
PKG: Proteína kinase G
cPLA2 α : Fosfolipase A2

R_{máx}: Resposta máxima

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

TXA₂: Tromboxano A₂

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Doenças cardiovasculares e hipertensão arterial	19
1.2	Endotélio vascular	21
1.3	Disfunção endotelial na Hipertensão arterial	24
1.4	Estresse oxidativo e Hipertensão arterial	26
1.5	Ciclooxygenases, prostanóides e hipertensão arterial	28
1.6	Inibidores da fosfodiesterase- 5 na hipertensão arterial	30
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAIS E METÓDOS	37
4.1	Animais experimentais	37
4.2	Grupos experimentais e tratamentos	37
4.3	Análise da pressão arterial sistólica (Plestismografia)	37
4.4	Estudo da função vascular	38
4.4.1	Participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta vasodilatadora dependente do endotélio	39
4.4.2	Participação do óxido nítrico (NO) na resposta vasodilatadora dependente do endotélio	39
4.4.3	Avaliação a produção basal do óxido nítrico (NO)	39
4.4.4	Participação do GMPc na resposta vasodilatadora da aorta	39
4.4.5	Participação da proteína kinase G na resposta vasodilatadora da aorta	40
4.4.6	Participação da proteína kinase A na resposta vasodilatadora da aorta	40
4.4.7	Avaliação da resposta contrátil dependente do endotélio em aorta	40
4.4.8	Participação dos prostanóides vasoconstrictores da Ciclooxygenase 1 na contratilidade vascular	40

4.4.9	Participação dos prostanóides vasoconstrictores da Ciclooxygenase 2 na contratilidade vascular.....	40
4.4.10	Avaliação da ativação do receptor de Tromboxano A2 na resposta contrátil em anéis de aorta	41
4.4.11		
4.5	Citômetro de fluxo.....	41
4.5.1	Análise da produção de espécies reativas de oxigênio	41
4.5.2	Quantificação de células progenitoras endoteliais circulantes (CPE).....	42
4.6	Capacidade antioxidante total (TAC).....	42
4.7	Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	42
4.8	Determinação de Nitrito e Nitrato.....	43
4.9	Determinação dos metabólitos urinários de tromboxano A2 (TXA2) e prostaciclina (PGI2).....	43
4.10	Análise morfológica do vaso.....	43
4.10.1	Verificação da área de secção transversa da aorta.....	44
4.10.2	Observação da superfície endotelial.....	44
4.11	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS	47
5.1	Efeito do tratamento com sildenafil na pressão arterial sistólica de animais espontaneamente hipertensos.....	47
5.2	Efeitos do sildenafil na vasoconstrição e na vasodilatação.....	47
5.3	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do óxido nítrico.....	49
5.4	Análises da biodisponibilidade de óxido nítrico vascular e plasmático.....	50
5.5	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do estresse oxidativo.....	51
5.6	Capacidade antioxidante total plasmática e peroxidação lipídica da aorta.....	52
5.7	Determinação dos níveis de $\bullet\text{O}_2$ em células de sangue total.....	53
5.8	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da via do GMPc.....	53

5.9	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da via da PKG.....	54
5.10	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da via da PKA....	55
5.11	Efeitos do sildenafil na resposta contrátil dependente do endotélio.....	56
5.12	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel das ciclooxigenase 1 e 2 na resposta contrátil.....	58
5.13	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da ciclooxigenase 1 na resposta contrátil.....	59
5.14	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da ciclooxigenase 2 na resposta contrátil.....	60
5.15	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do tromboxano A2 na resposta contrátil.....	61
5.16	Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do receptor de tromboxano A2 na resposta contrátil.....	62
5.17	Análise dos níveis urinários de prostanoídes em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).....	63
5.18	Recrutamento de células progenitoras endoteliais circulantes.....	64
5.19	Análise por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura da camada endotelial vascular.....	65

6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÃO	78
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares e Hipertensão arterial

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2016), as doenças cardiovasculares (DCV) são a maior causadora de mortes no mundo: mais pessoas morrem anualmente por DCV do que por outras doenças. Em 2016, um número de 17.9 milhões de pessoas morreram por DCV, representando 31% de todas as mortes mundiais, e dentre aqueles, 85 % foram por infarto agudo do miocárdio ou por acidente vascular encefálico (AVE) (1,2). As doenças cardiovasculares (DCVs) são um grupo de distúrbios do coração e vasos sanguíneos e incluem: doença cerebrovascular, doença arterial periférica, cardiopatia congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. Ataques cardíacos e derrames cerebrais são geralmente eventos agudos e são principalmente causados por um bloqueio que impede que o sangue flua para o coração ou cérebro. Os fatores de risco comportamentais mais importantes de doença cardíaca e acidente vascular cerebral são dieta não saudável, inatividade física, uso de tabaco e uso do álcool. Os efeitos dos fatores de risco comportamentais podem aparecer em indivíduos como aumento da pressão arterial, aumento da glicose no sangue, aumento de lipídios no sangue e obesidade. Esses “fatores intermediários de risco” podem ser medidos em unidades de atenção primária e indicam um risco maior de desenvolver um ataque cardíaco, derrame, insuficiência cardíaca e outras complicações cardiovasculares. A suspensão do uso de tabaco, redução de sal na dieta, consumo de frutas e legumes, atividade física regular e evitar o uso nocivo do álcool têm mostrado reduzir o risco de doença cardiovascular. Além disso, o tratamento medicamentoso do diabetes, hipertensão e colesterol sanguíneo elevados pode ser necessário para reduzir o risco cardiovascular e prevenir ataques cardíacos e derrames. Outros determinantes das DCVs incluem pobreza, estresse e fatores hereditários (3-6).

Dentre as DCVs, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) constitui importante fator de risco para complicações cardíacas e cerebrovasculares, sendo considerada um problema de saúde pública em âmbito mundial. A hipertensão arterial é uma doença definida pela persistência de pressão arterial sistólica acima de 135mmHg e diastólica acima de 85mmHg, sendo hoje considerada um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (7). É uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial (PA), e relacionada a alterações funcionais e estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos), com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais. Quando associada a outros fatores de risco como diabetes mellitus, obesidade, sedentarismo e tabagismo, os níveis pressóricos podem ser ainda mais elevados e as conseqüentes lesões de órgãos-alvo ainda mais graves. Mais de um bilhão de adultos em todo o mundo têm hipertensão com até 45% da população adulta afetada pela doença, e a alta prevalência de hipertensão é consistente em todos os estratos socioeconômicos e de renda, e a prevalência aumenta com a idade, representando até 60% da população acima dos 60 anos de idade. No ano de 2010, o relatório da pesquisa de saúde global publicado no Lancet, que compreende dados de pacientes de 67 países, relatou a hipertensão como a principal causa de morte e incapacidade em todo o mundo desde o ano de 1990. Nos Estados Unidos, a hipertensão arterial sozinha é responsável por mais mortes relacionadas a doenças cardiovasculares do que qualquer outro fator de risco modificável. Estimativas recentes sugerem que o número de pacientes com hipertensão pode aumentar até 15 a 20%, o que pode chegar a 1,5 bilhão em 2025 (8-11). Apesar dos esforços para desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial, sua causa permanece desconhecida em aproximadamente 95% dos pacientes, caracterizando a hipertensão primária ou essencial, que em muitos casos é assintomática e é diagnosticada incidentalmente no registro ou aferição da pressão arterial. Alguns casos se apresentam diretamente com sintomas de lesão de órgãos como sintomas de acidente vascular cerebral ou encefalopatia hipertensiva, dor torácica, falta de ar e edema agudo de pulmão (12).

Existem vários mecanismos descritos para o desenvolvimento da hipertensão, que incluem o aumento da absorção de sal, resultando em expansão de volume,

upregulation do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aumento da ativação do sistema nervoso simpático, e disfunção vascular. O estresse oxidativo é um fator envolvido em todos esses processos e pode ser decorrente do excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), da diminuição na produção de óxido nítrico (NO) ou da redução das vias antioxidantes nos sistemas cardiovascular e renal (13-16).

1.2 Endotélio vascular

O endotélio, descrito pela primeira vez há mais de 100 anos como uma barreira anatômica inerte entre o sangue e a parede do vaso, é agora reconhecido como um órgão dinâmico com funções secretoras, sintéticas, metabólicas e imunológicas. Formando um revestimento contínuo para cada vaso sanguíneo no corpo, as células endoteliais desempenham um papel obrigatório na modulação do tônus vascular e da permeabilidade, angiogênese e na mediação de respostas hemostáticas, inflamatórias e reparadoras à lesão local. Para cumprir esses papéis, o endotélio é altamente dinâmico, respondendo continuamente a mudanças espaciais e temporais em estímulos mecânicos e bioquímicos. Essa responsividade é afetada através de receptores por fatores de crescimento, lipoproteínas, produtos plaquetários e hormônios circulantes, que regulam as alterações na expressão de proteínas e RNAm, proliferação e migração celular ou liberação de mediadores vasoativos e inflamatórios (17-19).

Todas as células endoteliais vasculares têm uma origem embrionária comum, mas mostram uma heterogeneidade específica dependendo do leito vascular, na morfologia, função, expressão gênica e protéica. Assim, o endotélio não deve ser considerado como um tecido homogêneo, mas sim como um conglomerado de populações distintas de células que compartilham muitas funções comuns, mas também adaptadas para atender às demandas regionais. Além dessas variações estruturais, a heterogeneidade endotelial também se manifesta em diferenças regionais na liberação de mediadores vasoativos e inflamatórios, em resposta a alterações no estresse de cisalhamento e hipóxia, e na expressão de moléculas pró e anticoagulantes. Por exemplo, a expressão endotelial do mediador pró-trombótico do fator von Willebrand (FvW) é uma função das células endoteliais encontradas em

vasos de tamanho pequeno. Da mesma forma, a contribuição do óxido nítrico (NO) para a vasodilatação dependente do endotélio é muito maior nas artérias de grande calibre em comparação com os pequenos vasos de resistência. Estas diferenças bioquímicas e fenotípicas regionais entre as células endoteliais estendem-se à sua susceptibilidade à lesão em face de fatores de risco cardiovascular, como hipercolesterolemia, diabetes e tabagismo e, portanto, influenciam a função da vasculatura tanto na saúde quanto na doença (20-23).

O endotélio vascular regula o tônus vascular e estrutura em vasos de condutância e resistência através da liberação contínua de uma variedade de mediadores vasoativos autócrinos e parácrinos como óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS), endotelina-1 (ET-1), angiotensina (Ang) II, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI₂) e ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) (24-25). É importante ressaltar que a posição do endotélio na parede do vaso o torna um alvo primário para lesões. Como mostrado na representação esquemática na Figura 1, tensão de cisalhamento e acetilcolina (ACh), que é comumente usada para avaliar a função endotelial, e outros agonistas específicos como bradicinina, trombina e serotonina, causam aumento nos níveis de Ca⁺⁺ intracelular. Esse aumento no Ca⁺⁺ ativa a sintetase endotelial do NO (eNOS), que atua na L-arginina (L-arg), resultando na produção de NO. Essa reação requer a participação de cofatores, como a tetraidrobiopterina (BH₄) e NADPH, que são críticos para o acoplamento da redução do oxigênio molecular (O₂) e a oxidação de L-arg, resultando na produção de NO e L-citrulina. O NO difunde-se às células musculares lisas vasculares subjacentes (CMLV), onde ativa a guanilil ciclase solúvel (GCs) para produzir guanosina monofosfato cíclico (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) e induz uma diminuição no Ca⁺⁺ intracelular seguida de relaxamento das CMLV (26-28).

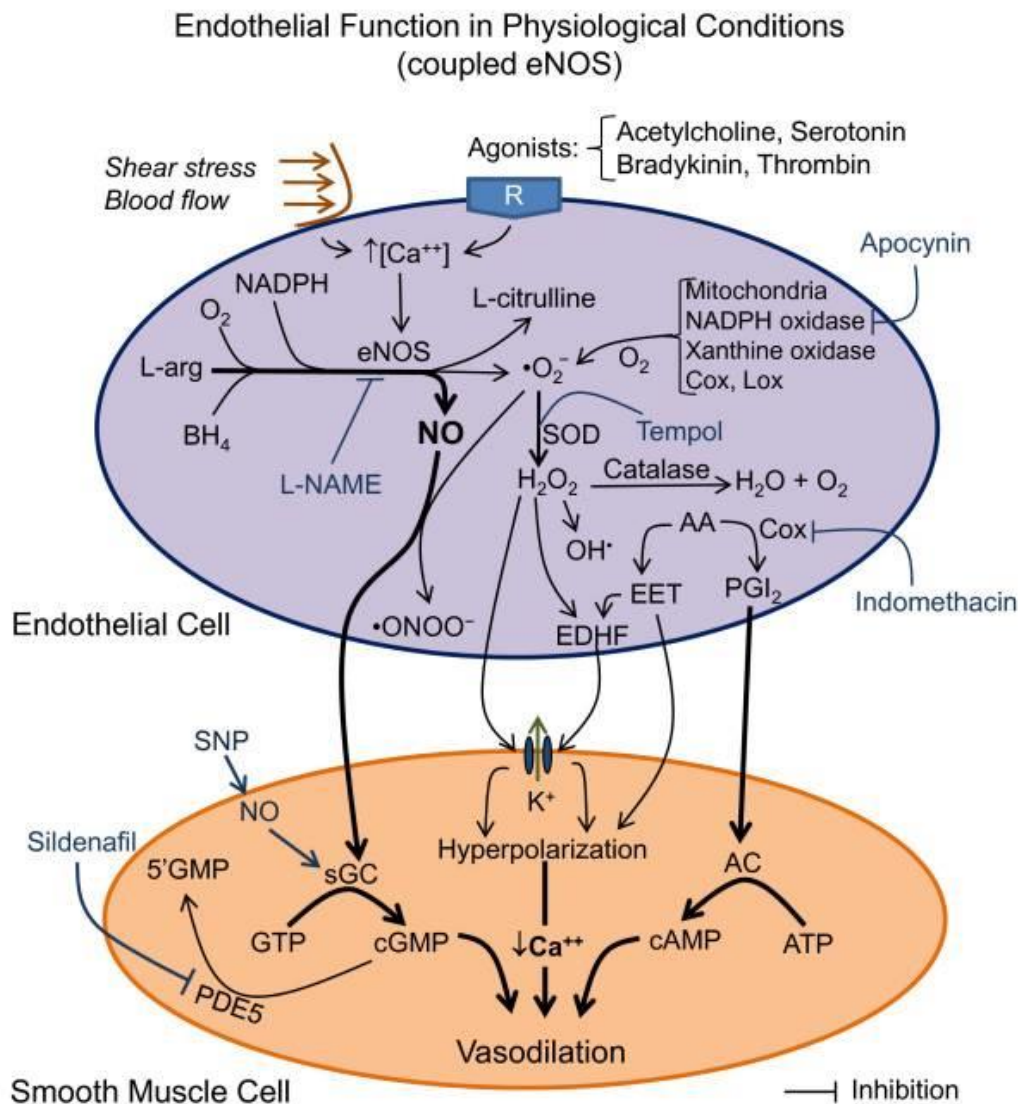


Figura 1: Esquema representativo das possíveis vias bioquímicas para a produção de NO e de outras substâncias vasoativas pelo endotélio em condições fisiológicas (MEYRELLES et al.,2011)

Sendo assim, o endotélio é um importante regulador do tônus vascular. As células endoteliais produzem um grande número de substâncias vasoativas, das quais o NO é o mais importante na regulação da PA. O NO é continuamente liberado pelas células endoteliais em resposta à tensão de cisalhamento induzida pelo fluxo, levando ao relaxamento do músculo liso vascular. A interrupção da produção de NO via inibição da NO sintase endotelial (eNOS) causa elevação da PA e constitui como uma das principais causas no desenvolvimento de hipertensão em animais e humanos (28).

1.3 Disfunção endotelial na Hipertensão arterial

O endotélio pode ser considerado como um órgão endócrino, capaz de promover síntese e liberação de fatores metabolicamente ativos, e que participam da regulação do tônus vascular. Também atua na manutenção da homeostase, na participação de respostas inflamatórias e imunológicas, agregação plaquetária e regulação do crescimento vascular e na via de substâncias coagulantes e anticoagulantes. Sendo assim, o endotélio atua de modo relevante no controle do tônus vascular e da resistência vascular periférica, a partir da liberação de substâncias vasoativas. Alterações na síntese desses fatores podem interferir na gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial. Alterações na função endotelial como, por exemplo: diminuição de fatores vasodilatadores e aumento da síntese de fatores vasoconstritores, podem promover elevação da resistência vascular e, conseqüentemente, da pressão arterial (19, 29,30).

A disfunção endotelial pode ser definida como um desequilíbrio entre fatores vasodilatadores e fatores constritores, pró e anticoagulantes e inibidores ou promotores de crescimento. A função endotelial é avaliada por estudos de reatividade vascular realizados em diferentes tipos vasculares. A abordagem clássica é estimular a produção de óxido nítrico por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina, metacolina, bradicinina e substância P (26).

Fatores de risco para eventos cardiovasculares como, diabetes mellitus, aterosclerose e hipertensão estão associados com aumento de ERO's ou aumento do estresse oxidativo. O aumento do estresse oxidativo é considerado como um dos principais mecanismos envolvidos na patogênese da disfunção endotelial. Vários sistemas enzimáticos, incluindo NADPH oxidase, xantina oxidase e ciclooxigenase, bem como diminuição da atividade da superóxido dismutase, geram espécies reativas de oxigênio, como o superóxido. O excesso de ânions superóxido se liga ao NO, diminuindo a biodisponibilidade do NO e gerando o peroxinitrito, o qual é oxidante pró-inflamatório. A disfunção endotelial de grandes vasos em animais SHR e em outras doenças cardiovasculares tem sido atribuída a diminuição na produção de NO pela eNOS, e produção excessiva de EROs vasculares, onde $\bullet O_2$ - reage com NO, resultando na formação de $\bullet ONOO^-$ (peroxinitrito) (31-34) (figura 2).

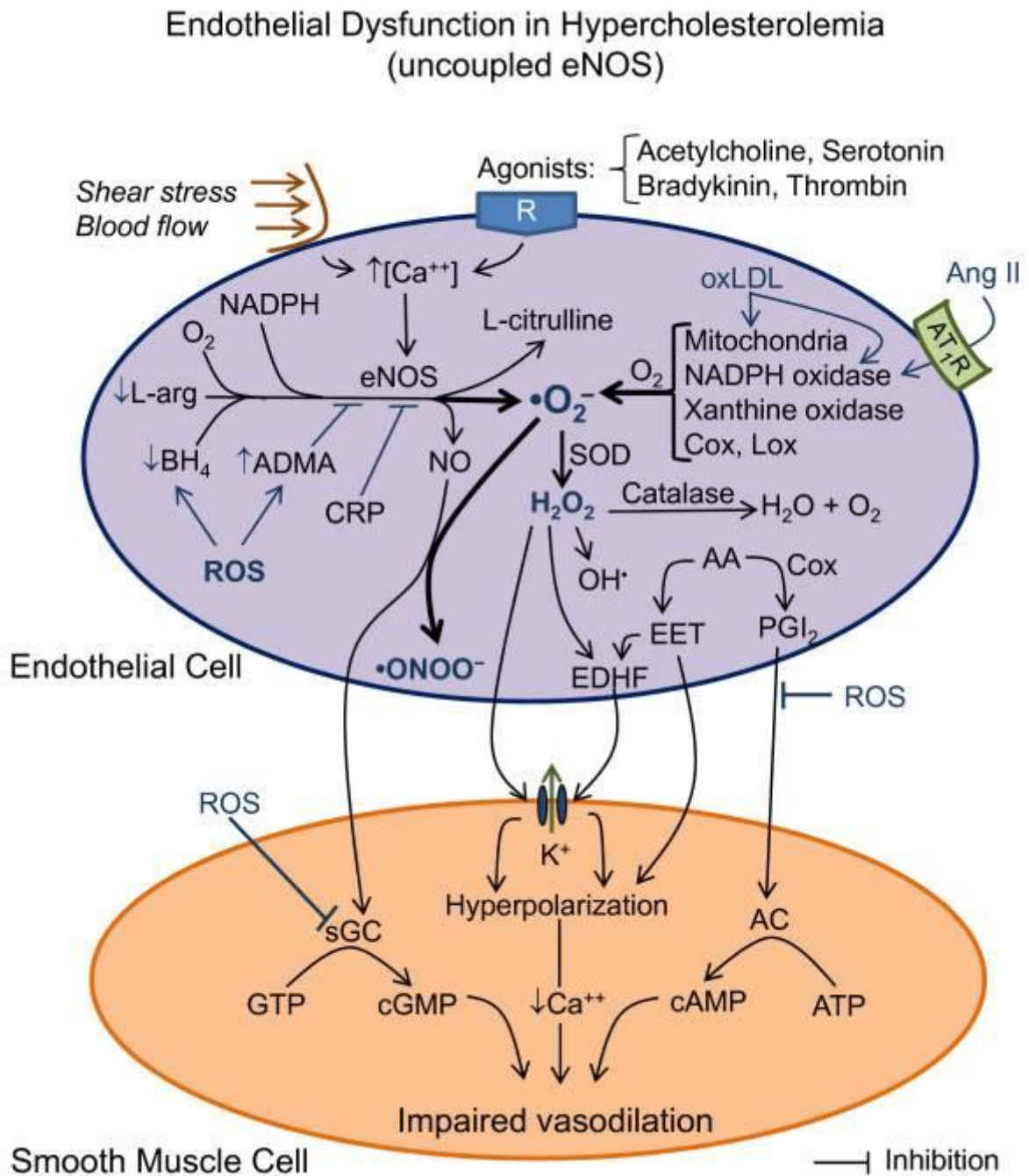


Figura 2: Esquema representativo das possíveis vias bioquímicas para a produção de NO e de outras substâncias vasoativas na disfunção endotelial (MEYRELLES et al.,2011)

1.4 Estresse oxidativo e Hipertensão arterial

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são metabólitos de oxigênio que podem retirar os elétrons de outras moléculas (oxidar), doar elétrons a moléculas (reduzir) ou reagir e se tornar parte de moléculas (isto é, modificação oxidativa). Muitas EROs possuem um elétron desemparelhado em seu orbital externo e são, portanto, radicais. Um radical particularmente importante para a biologia cardiovascular é o superóxido (O_2^-), que é formado pela redução de oxigênio por um elétron. O superóxido (O_2^-) é importante porque pode servir tanto como oxidante quanto como redutor em sistemas biológicos e é um progenitor para outras EROs. Outros radicais incluem o radical hidroxila (HO), o radical peróxido lipídico (LOO) e os radicais alcoxi (LO) (34,35). Outras moléculas, incluindo peroxinitrito (ONOO), ácido hipocloroso (HOCl) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não são radicais, mas têm fortes propriedades oxidantes e, portanto, são incluídas como ROS. Outro grupo relevante de moléculas são as espécies reativas de nitrogênio (RNS), incluindo o óxido nítrico (NO) e o radical dióxido de nitrogênio (NO_2). O peroxinitrito ($\bullet ONOO^-$) é considerado tanto um ROS como um RNS e é formado pela reação entre O_2^- e NO. RNS são importantes, porque muitas vezes reagem e modificam proteínas e outras estruturas celulares e alteram a função desses alvos. As principais fontes de ROS incluem NADPH oxidase, xantina oxidase, citocromo P450, óxido nítrico sintase endotelial sintase (enzima eNOS produz O_2^- em vez de NO), mieloperoxidases e lipoxigenases. Na figura 3 é mostrada a formação de algumas ROS e suas principais fontes (36-38).

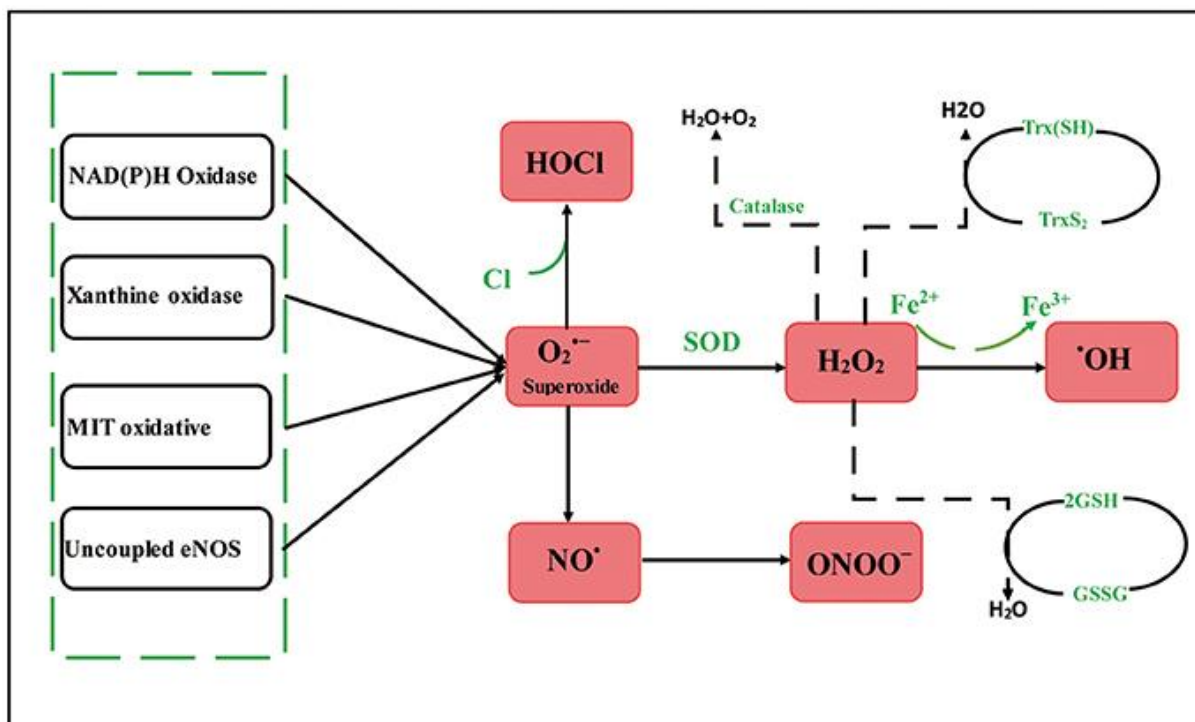


Figura 3. Vias de produção de ROS em células de mamíferos. São mostradas enzimas consideradas importantes na hipertensão, que podem doar elétrons ao oxigênio para formar superóxido ($O_2^{\bullet-}$). H_2O_2 também pode ser formado pela ação da (SOD) sobre o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e é ainda reduzido a água por catalase ou glutathiona peroxidases (Gpx). $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 podem sofrer reações com metais de transição para formar $\bullet OH$. H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; $\bullet OH$, radical hidroxila; SOD, superóxido dismutase.

O estresse oxidativo é originado por uma alteração no equilíbrio da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mecanismos de defesa antioxidante. Concentrações homeostáticas de EROs desempenham um papel crucial como mensageiros secundários em muitas vias de sinalização intracelular, tanto em respostas imunes inatas quanto adaptativas. O problema ocorre quando a biodisponibilidade de EROs supera as defesas antioxidantes. Nessas condições, as ERO'S agem como agentes destrutivos que afetam proteínas, lipídios e DNA, levando a danos celulares, lesões teciduais e inflamação (39).

O estresse oxidativo tem sido associado à patogênese de vários distúrbios crônicos, como doenças neurodegenerativas, diabetes, hipercolesterolemia e aterosclerose, e é um fator patogênico contributivo nos distúrbios relacionados à hipertensão. Além disso, o estresse oxidativo vascular é uma das principais causas de doenças cardiovasculares, associado a vasoconstrição, remodelamento vascular, inflamação e fibrose, e a proteção celular insuficiente contra o estresse oxidativo tem sido

descrita como um fator importante para o desenvolvimento de doenças vasculares (40-42).

Uma vasta produção literária demonstrou que a geração excessiva de ROS contribui para a hipertensão e que a diminuição de ROS diminui a pressão sanguínea. Além do mais, há ampla evidência sugerindo que a NADPH oxidase é a principal fonte de estresse oxidativo na hipertensão, e sua atividade e expressão são upregulados por estímulos hipertensivos. Apesar das evidências substanciais de que o estresse oxidativo contribui para a hipertensão, não há uma compreensão clara de como isso acontece. A hipertensão está associada ao aumento da formação de EROs em múltiplos órgãos, incluindo o cérebro, a vasculatura e o rim, os quais podem contribuir para a hipertensão (43-45).

Talvez o alvo mais estudado de lesão oxidativa na hipertensão seja a vasculatura, e principal fonte de O_2^- em vasos é a NADPH oxidase. O aumento da produção vascular de O_2^- é, em grande parte, responsável pela redução da vasodilatação dependente do endotélio. A eliminação de O_2^- com a utilização de miméticos da SOD melhora notavelmente a vasodilatação dependente do endotélio em vasos de animais hipertensos, enquanto que tem efeitos mínimos na vasculatura de animais saudáveis. Além do mais, a administração intra-arterial de grandes quantidades de vitamina C melhora a vasodilatação causada pela acetilcolina, e em outro determinado estudo realizado por Nakazono e colaboradores foi mostrado que a administração *in bolus* de uma forma modificada da enzima SOD reduziu drasticamente a pressão arterial em ratos hipertensos, mostrando desta forma a íntima relação do estresse oxidativo com a disfunção endotelial na causa da hipertensão arterial (46-47).

1.5 Ciclooxygenases, prostanóides e hipertensão arterial

Nas doenças cardiovasculares a disfunção endotelial é devida em parte à liberação de fatores contráteis derivados do endotélio que neutralizam o efeito vasodilatador do óxido nítrico. As contrações dependentes do endotélio envolvem a ativação de ciclooxygenases endoteliais e a liberação de vários prostanoídes, que ativam os receptores de tromboxano (TP) do músculo liso vascular subjacente. A estimulação

dos receptores de TP provoca não apenas a contração e a proliferação de células musculares lisas vasculares, mas também diversas reações fisiológicas/fisiopatológicas, incluindo agregação plaquetária e ativação de respostas pró-oxidantes e inflamatórias endoteliais (48-50).

Dentre os fatores contráteis liberados pelo endotélio, as prostaglandinas são as mais importantes, lipoxigenases, lipoxigenases e monooxigenases do citocromo P450. A primeira ciclooxigenase (COX-1) foi purificada em 1976 e subsequentemente clonada em 1988. É geralmente assumido que a COX-1, na maioria dos tecidos, é expressa constitutivamente, enquanto a COX-2 é induzida principalmente em locais de inflamação (52). No entanto, a COX-2 também é expressa constitutivamente em vários órgãos e tipos de células, incluindo as células endoteliais, onde sua expressão é regulada pelo estresse de cisalhamento. Na parede vascular, ambas as células musculares lisas endoteliais e vasculares contêm COXs; Na aorta de rato, onde ambas as isoformas das COXs são detectadas, a quantidade de transcritos da COX-2 nas células endoteliais e do músculo liso é claramente menor do que a da COX-1. No entanto, em humanos, várias evidências indicam que, embora a COX-2 seja a contribuinte predominante na geração sistêmica de prostaciclina, a COX-1 endotelial, tanto em vasos sanguíneos saudáveis quanto doentes, parece ser também uma importante fonte de prostaglandinas vasculares. Vários eicosanóides biologicamente ativos são formados, através da ação de um conjunto de sintases, PGD, PGE, PGF, PGI e tromboxane sintases. Estas prostaglandinas então interagem com receptores transmembrana específicos acoplados à proteína G, que são classificados em cinco subtipos de receptores DP, EP, FP, IP e TP em função de sua sensibilidade aos cinco prostanoides primários, prostanglandinas D₂, E₂, F₂ α , I₂ (prostaciclina) e tromboxano A₂, respectivamente. A estimulação dos receptores TP desencadeia diversas respostas fisiológicas/fisiopatológicas, incluindo agregação plaquetária e contração do músculo liso. Além disso, a ativação de receptores TP endoteliais promove a ativação de enzimas oxidantes como NADPH Oxidase. Embora o tromboxano A₂ seja o ligante fisiológico preferencial do receptor TP, a PGH₂ e as outras prostaglandinas, em diferentes graus de afinidade, também podem ativar esse receptor. A prostaciclina é um potente inibidor da adesão de plaquetas à superfície das células endoteliais e da agregação plaquetária, e é geralmente descrita como um vasodilatador derivado do endotélio, portanto, exercendo efeitos contrários ao do tromboxano A₂. Porém em concentrações

elevadas, a prostaciclina pode se ligar ao receptor TP e exercer efeitos da via do tromboxano A₂ (53-58).

Em aortas de SHR, a COX-1 é a enzima preponderante envolvida na geração de fatores contráteis derivados do endotélio, uma vez que as contrações dependentes do endotélio são bloqueadas por inibidores específicos da COX-1 e minimamente afetadas por inibidores específicos da COX-2. De fato, células endoteliais da aorta de várias espécies expressam preferencialmente COX-1 ao invés da COX-2 e, em células endoteliais de SHR, o RNAm e a expressão proteica da COX-1 são aumentados quando comparados ao de animais WKY. Além disso, a COX também está envolvida na produção endotelial de espécies reativas de oxigênio, as quais contribuem com a diminuição da biodisponibilidade de NO e ativam a COX. Isso pode envolver uma retroalimentação positiva nas células endoteliais, ativando ainda mais a COX e, como as espécies reativas de oxigênio se difundem para as células do músculo liso vascular, elas podem estimular também a COX nas células musculares lisas e produzir mais prostanoídes contráteis. Somado a isso, as espécies reativas de oxigênio geradas pela ativação dos próprios receptores TP, aumentam a estabilidade e a densidade dos receptores TP funcionais na membrana celular. Assim, enquanto os receptores TP ativados estão sendo internalizados e degradados, uma via inversa dependente de espécies de oxigênio induz a biogênese aumentada de novos receptores TP. A ativação desse mecanismo de feedback positivo pode estar por trás da expressão aumentada destes receptores observada em doenças cardiovasculares. Finalmente, os receptores TP também são expressos em células endoteliais e sua estimulação pode promover a inibição da produção de NO. Esta relação dos receptores de tromboxano com as espécies reativas de oxigênio associada a uma diminuição da produção de NO, alterando ainda mais o desequilíbrio entre fatores de relaxamento e contração e exacerbando a disfunção endotelial, sugere que estes receptores desempenham papel fundamental nas doenças cardiovasculares (59-63).

1.6 Inibidores da fosfodiesterase- 5 na hipertensão arterial

Diversos estudos demonstraram que os inibidores da PDE5 podem exercer efeitos sistêmicos, além de efeitos benéficos pulmonares e na disfunção erétil. A descoberta

de que o sildenafil promove melhora na via de sinalização NO / GMP por inibir a degradação do GMPc nas células musculares vasculares resultou em um número crescente de estudos focados em possíveis efeitos benéficos extras- sexuais do sildenafil. Alguns estudos já demonstraram anteriormente que o sildenafil pode inibir a atividade da NADPH oxidase e, conseqüentemente, diminuir a formação de O₂ na vasculatura de modelos de doença cardiovascular, como na aterosclerose e na hipertensão renovascular (41,64). A importância fisiológica da PDE5 na regulação do tônus do músculo liso tem sido demonstrada em estudos clínicos que utilizavam inibidores específicos desta enzima no tratamento da disfunção erétil e remodelamento vascular. Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram que o tratamento com sildenafil foi capaz de promover melhora no relaxamento vascular além de diminuir o dano no DNA de animais ateroscleróticos e com hipertensão renovascular 2R1C (64-65).

Portanto, mediante o exposto, este estudo tem como proposta investigar a eficácia do inibidor da fosfodiesterase-5, sildenafil, na função vascular (relaxamento e contração) utilizando o modelo de hipertensão espontânea (SHR) e, conseqüentemente avaliar se este tratamento é capaz de reduzir os danos provocados pelo aumento do estresse oxidativo e promover melhora da função endotelial, e quais os possíveis mecanismos por trás da melhora.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica com alta incidência na população, sendo capaz de promover redução da qualidade de vida e gerar custos elevados para o sistema de saúde. Assim como em outras doenças cardiovasculares, a HA está associada a disfunção endotelial e vascular. A disfunção endotelial na hipertensão leva ao desequilíbrio da produção/liberação dos fatores contráteis e relaxantes, provoca diminuição da geração de óxido nítrico/aumento das espécies reativas de oxigênio e promove aumentando do tônus vascular. Estudos na área vascular com o intuito de melhor entender os mecanismos por trás da disfunção endotelial em doenças cardiovasculares são necessários para a produção de novos tratamentos. Estudos recentes em nosso e em outros laboratórios demonstraram que o inibidor da PDE-5, sildenafil, é capaz de promover melhora na função vascular de diversos modelos de doença cardiovascular (aterosclerose, diabetes, hipertensão renovascular no 2 rins e 1 clipe, hipertensão essencial no SHR). Contudo, poucos estudos foram realizados no modelo SHR com o intuito de investigar os efeitos vasculares do sildenafil na disfunção vascular do SHR.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com sildenafil nas alterações vasculares observadas no modelo de hipertensão essencial, SHR.

3.2 Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos do tratamento com sildenafil em ratos espontaneamente hipertensos sobre os seguintes parâmetros:

- 1) Pressão arterial sistólica;
- 2) Reatividade vascular da aorta à fenilefrina e à acetilcolina;
- 3) Participação de ROS, do NO, das ciclooxigenases 1 e 2, e do receptor de tromboxano nas respostas vasculares da aorta;
- 4) Estresse oxidativo:
 - Produção de $\bullet\text{O}_2^-$ sistêmica
 - Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) no plasma;
 - Capacidade antioxidante total (CAT)
- 5) Níveis de células progenitoras endoteliais
- 6) Morfometria vascular.
- 7) Arquitetura endotelial

MATERIAIS E MÉTODOS

4.0 Materiais e métodos

4.1 Animais experimentais

O presente estudo foi realizado em ratos SHR machos com 4 meses de idade e Wistar pareados por idade, ambos mantidos na unidade de cuidados de animais da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil. Os ratos foram aclimatados e alojados em gaiolas plásticas individuais com temperatura controlada (22-23 ° C) e ciclo claro-escuro (12:12 h) e foram alimentados com ração padrão para roedores e providos de água ad libitum. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes para o cuidado e uso de animais de laboratório, conforme recomendado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA).

4.2 Grupos experimentais e tratamentos

Foram utilizados ratos SHR machos com 4 meses de idade e Wistar pareados por idade. O grupo SHR tratado recebeu sildenafil na dose de 40 mg/Kg/dia. Os animais veículo e Wistar controle receberam água. As doses foram administradas por gavagem diariamente durante 3 semanas.

4.3 Análise da pressão arterial sistólica (Pletismografia)

A análise da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada por meio da pletismografia de cauda, uma medida indireta de avaliação da pressão arterial sistólica (PAS). A pletismografia de cauda foi realizada por meio da utilização do pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA), conectado a um computador para armazenamento dos registros de pressão. Foram realizadas as medidas da PAS antes e logo após o tratamento.

O registro da pressão foi realizado em animais acordados, em ambiente livre de ruído e mantido sob-restrição de movimento em um contentor de acrílico, com a temperatura corporal mantida em aproximadamente 32°C, com auxílio de uma manta aquecedora. Foram considerados valores obtidos em condição de ausência de movimentação espontânea da cauda do animal, e utilizadas a média das 3

últimas medidas consecutivas. Os animais foram adaptados, durante três dias antes da mensuração.

4.4 Estudo da função vascular

Para estudo da função vascular de vasos de condutância, utilizamos a aorta segundo o protocolo de trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório.

Após o final do tratamento os ratos foram eutanasiados e submetidos a toracotomia; a aorta dos animais foi retirada cuidadosamente para avaliação da função vascular e colocada em placa de Petri contendo solução nutritora (NaCl 115 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; CaCl₂.H₂O 2,5 mM; KH₂PO₄ 1,2mM; NaHCO₃ 25 mM; EDTA 0,1 mM; Glicose 11,10mM). Imediatamente, o tecido conjuntivo foi cuidadosamente retirado e a aorta foi cortada em 3 anéis de aproximadamente 3 milímetros cada. Em seguida, os anéis foram acoplados, por meio do lúmen vascular, a triângulos de aço inoxidável paralelamente. Em seguida, foram acondicionados em cubas de vidro de 5 mL de volume, contendo a mesma solução nutritora, que foi constantemente aerada por uma mistura carbogênica com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e mantida a 37°C com auxílio de um banho-maria com circulação de água. Um dos triângulos foi fixado à parede da cuba e o outro, acoplado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica, conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100, Biopac Systems, Califórnia, EUA). Desta maneira, alterações no diâmetro vascular frente à adição de drogas vasoativas foram captadas e enviadas a um computador.

A viabilidade dos anéis foi avaliada por meio de incubação com cloreto de potássio (KCl) 125 Mm, durante 30 minutos, sendo esse o padrão ouro para avaliação de contração máxima vascular. Foram considerados viáveis os anéis cuja contração máxima atingiu, no mínimo, o dobro do valor basal de tensão que é 2,0 gramas.

Os protocolos de reatividade vascular foram executados por meio da construção de curvas concentração resposta a substâncias vasoativas. Neste caso, após a estabilização de 30 minutos, os vasos foram submetidos a doses crescentes de fenilefrina (FE 10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁵ M) ou acetilcolina (ach10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁵ M) , permitindo o registro da variação de tensão em função do tempo.

4.4.1 Participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Para verificação da influência de ROS, produzidos pela NADPH oxidase na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foi realizado o bloqueio dessa enzima por 30 minutos com Apocinina (30 μ M), seguido da curva padrão, concentração–resposta, de relaxamento com acetilcolina após pré-contração com fenilefrina.

4.4.2 Participação do óxido nítrico (NO) na resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Para avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foi realizado - por um período de 30 minutos - o bloqueio com N^G – nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 μ mol/L), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), seguido da curva padrão, concentração –resposta, de relaxamento com acetilcolina após pré-contração com fenilefrina.

4.4.3 Avaliação a produção basal do óxido nítrico (NO)

Para avaliar a produção basal do NO, foi realizado - por um período de 30 minutos - o bloqueio com N^G – nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 1 μ mol/L), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS). Posteriormente foi analisada a diferença de tônus basal antes e após o bloqueio.

4.4.4 Participação do GMPc na resposta vasodilatadora da aorta

Para avaliar a participação do GMPc na resposta vasodilatadora, foi realizado uma curva padrão ,concentração –resposta, de relaxamento com sildenafil após pré-contração com fenilefrina.

4.4.5 Participação da proteína kinase G na resposta vasodilatadora da aorta

Para avaliar a participação do GMPc na resposta vasodilatadora, foi realizado uma curva padrão ,concentração –resposta, de relaxamento com 8-Br-GMPc, após pré-contração com fenilefrina.

4.4.6 Participação da proteína kinase A na resposta vasodilatadora da aorta

Para avaliar a participação do GMPc na resposta vasodilatadora, foi realizado uma curva padrão ,concentração –resposta, de relaxamento com 8-Br-AMPC, após pré-contração com fenilefrina.

4.4.7 Avaliação da resposta contrátil dependente do endotélio em aorta

Para avaliar a resposta contrátil dependente do endotélio, foi realizado uma curva concentração –resposta à acetilcolina, sem pré-contração, após o bloqueio da NO sintase endotelial com L-NAME.

4.4.8 Participação dos prostanóides vasoconstrictores da Ciclooxygenase 1 na contratilidade vascular

Para verificação da influência dos produtos derivados da COX-1 na resposta contrátil dos vasos, foi realizado o bloqueio - por 30 minutos - com SC-560 (1 $\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo da COX-1, seguido da curva padrão à fenilefrina.

4.4.9 Participação dos prostanóides vasoconstrictores da Ciclooxygenase 2 na contratilidade vascular

Para verificação da influência dos produtos derivados da COX-2 na resposta contrátil dos vasos, foi realizado o bloqueio - por 30 minutos - com ns-398 (1 $\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo da COX-2, seguido da curva padrão à fenilefrina.

4.4.10 Avaliação da ativação do receptor de Tromboxano A2 na resposta contrátil em anéis de aorta

Para avaliar se os prostanoídeos produzidos pelas COX-1 atuam através de receptores de Tromboxano A2 (TXA₂) e com isso altera a resposta contrátil de anéis de aorta, foi realizado, por um período de 30 minutos, o bloqueio com SQ-29548 (1 µmol/L), que é um antagonista do receptor de TXA₂, seguido da curva padrão com fenilefrina.

4.5 Citômetro de fluxo

4.5.1 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio

O conteúdo intracitoplasmático de O₂^{•-} foi determinado em sangue total, como descrito anteriormente. O dihidroetídio é oxidado pelo superóxido a etídio, que é um composto que emite fluorescência, a qual será detectada por citometria de fluxo. Para realização do ensaio as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS na concentração de 1x10⁶ células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160µM) por 30 minutos a 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadas 5 minutos com 10 µM doxorrubicina e para controle negativo as amostras foram incubadas apenas com etanol. A aquisição de dados foi feita através do citômetro de fluxo (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva (Becton Dickinson, San Juan, CA) e a sobreposição dos histogramas foram construídas usando o FCS Express software. Para quantificação da fluorescência emitida pelo DHE, as amostras foram analisadas em duplicata, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura, as células foram excitadas a 488 nm e os sinais foram obtidos utilizando 585/42 e 530/30, respectivamente, e os dados foram expressos em média geométrica da intensidade de fluorescência emitida (MFI).

4.5.2 Quantificação de células progenitoras endoteliais circulantes (CPE)

Após a coleta do sangue total e remoção dos eritrócitos, as amostras foram purificadas por seleção negativa com anticorpos monoclonais contra CD3e (cadeia CD3 ϵ), CD11b (cadeia Integrina α M), CD45R / B220, Ly-6G e Ly-6C (Gr1), e TER-119 / Células Eritróides (Ly-76) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) por 15 min em gelo, para eliminar as células não comprometidas com a linhagem. Posteriormente, as células foram magneticamente marcadas, e transferidas para uma coluna BD IMagnet (BD), e a fração celular depletada (Lin⁻) foi cuidadosamente coletada e analisada por citometria de fluxo para quantificação da CPE circulante. As alíquotas de células (1×10^6 células / mL de PBS) foram coradas para imunofenotipagem de CPE utilizando CD117-PECy7 anti-rato e CD31-APC (BD) durante 20 min no escuro. De cada amostra, 100.000 eventos foram adquiridos (FACS Canto II, BD Bioscience) e processados usando o software FACS Diva (Becton-Dickinson, BD, CA, EUA). As CPE circulantes foram definidas como células duplamente positivas e Lin negativa, CD117 / CD31- (Lin⁻ / CD117 + / CD31 +).

4.6 Capacidade antioxidante total (TAC)

O TAC foi medido pelo método DPPH (Brand-williams et al., 1995) que é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1- pirilhidrazila) por antioxidantes, produzindo uma diminuição da absorbância a 515 nm.

4.7 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica da aorta foi determinada utilizando o ensaio espectrofotométrico de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) baseado na reação entre malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (TBA). Resumidamente, 50 μ L de plasma foram diluídos com 125 μ L de ácido tricloroacético a 17,5% e 125 μ L de TBA a 0,6%. Após serem agitados e vortexados, os tubos foram fervidos por 30 min e resfriados em gelo antes de serem diluídos com 125 μ L de ácido tricloroacético a 70%. As amostras foram então centrifugadas,

e a fase superior foi lida a 532 nm usando um espectrofotômetro, sendo esse parâmetro quantificado como nmol de MDA / mg de proteína.

4.8 Determinação de Nitrito e Nitrato

A produção de NO foi avaliada pela quantidade de de nitrito acumulado no plasma usando o ensaio colorimétrico de Griess. Em resumo, 100 µL de padrões plasmáticos ou nitritos (diluições seriadas de NaNO₂ em meio não condicionado; SigmaAldrich, St. Louis, MO) foram misturados com 100 µL de reagente de Griess, contendo 50 µL de sulfanilamida a 1% e 50 µL de 0,1. Di-hidrocloreto de naftiletileno-diamina (Sigma) em H₃PO₄ 2,5 M para medição de nitrito. A absorvância foi medida a 540 nm.

4.9 Determinação dos metabólitos urinários de tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaciclina (PGI₂)

Para quantificação dos metabólitos urinários de tromboxano A₂ (Tromboxano B₂) B₂ ELISA Kit e metabólito urinário de prostaciclina (Prostaglandina F_{2α}) foram utilizados kit de ELISA da Cayman, Thromboxane B₂ ELISA Kit (Item n° 501020) e Prostaglandin F_{2α} ELISA Kit (Item n° 516011), respectivamente. Urinas de 24 foram utilizadas, obtidas por meio do usp das gaiolas metabólicas.

4.10 Análises morfológica do vaso

Para análise morfológica dos vasos, os animais foram submetidos à perfusão com solução fixadora contendo paraformaldeído (2%), glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato (0,1 M, pH 7,2). Após a perfusão dos animais, as aortas foram retiradas. Imediatamente, o excesso de tecido conjuntivo foi cuidadosamente removido; e as aortas mantidas na solução fixadora por mais 24 horas, sendo posteriormente processadas para avaliação da área de secção transversa.

4.10.1 Verificação da área de secção transversa da aorta

Após o período de fixação, as artérias aortas foram emblocadas em parafina e obtidas secções com 5 µm de espessura. Após realização dos cortes e fixadas a lâminas, as amostras foram coradas com picrossirius; e as imagens capturadas com uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha), utilizando objetivas de 10x e 40x para aorta. Para a análise morfométrica, foi utilizada a ferramenta “*Freehand selections*” do *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Para verificação da parede do vaso, foi medida a área da camada íntima e média e verificamos se houve aumento da parede do vaso pelo cálculo da diferença entre a área do vaso e a área do lúmen (área camadas média/íntima + lúmen - área lúmen).

4.10.2 Observação da superfície endotelial

Após o período de fixação, as aortas foram lavadas em tampão cacodilato (0,1 M, ~pH 7,2) e posteriormente foram mantidas em uma solução de pós fixação contendo tampão cacodilato (0,1M), tetróxido de ósmio (1,0%) e ferrocianeto de potássio (1,25%), durante 1 hora. Após esse período, o tecido foi lavado com tampão cacodilato (0,1 M) e com água destilada. As artérias foram cortadas de modo que houvesse exposição da superfície endotelial e, em seguida, passaram por processo de desidratação em etanol, utilizando diferentes concentrações (30, 50, 70, 90,100%), após período de desidratação foram processadas no ponto crítico, em que a são submetidos ao processo de secagem com CO₂. Após secagem de todo material, uma camada de ouro de 10 nm foi evaporada na superfície tecidual. Para obtenção das imagens utilizamos um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. USA). As imagens das artérias foram obtidas com um aumento de x600.

4.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os resultados de reatividade vascular obtidos da aorta das curvas concentração-

resposta à fenilefrina e acetilcolina foram expressos como % de contração em relação a resposta máxima de contração ao KCl e porcentagem de relaxamento, respectivamente. Foi realizado ANOVA de uma via, completamente randomizada, exceto na análise temporal da PA e na comparação das curvas com FE e Ach na aorta, em que, a ANOVA utilizada foi de duas vias para medidas repetidas. Seguido teste de *post-hoc* de Tukey. Utilizamos o software de bioestatística Prima 8.0. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5.0 Resultados

5.1 Efeitos do tratamento com sildenafil na pressão arterial sistólica de animais espontaneamente hipertensos.

Conforme esperado e demonstrado na literatura, animais SHR apresentaram elevados níveis de pressão arterial sistólica (variando de 190 a 200 mmHg) em comparação com os ratos Wistar, que apresentavam valores de 98 a 102 mmHg (Figura 4). A administração de sildenafil por três semanas provocou queda significativa neste parâmetro, ou seja, o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a PAS dos animais hipertensos em aproximadamente 15%.

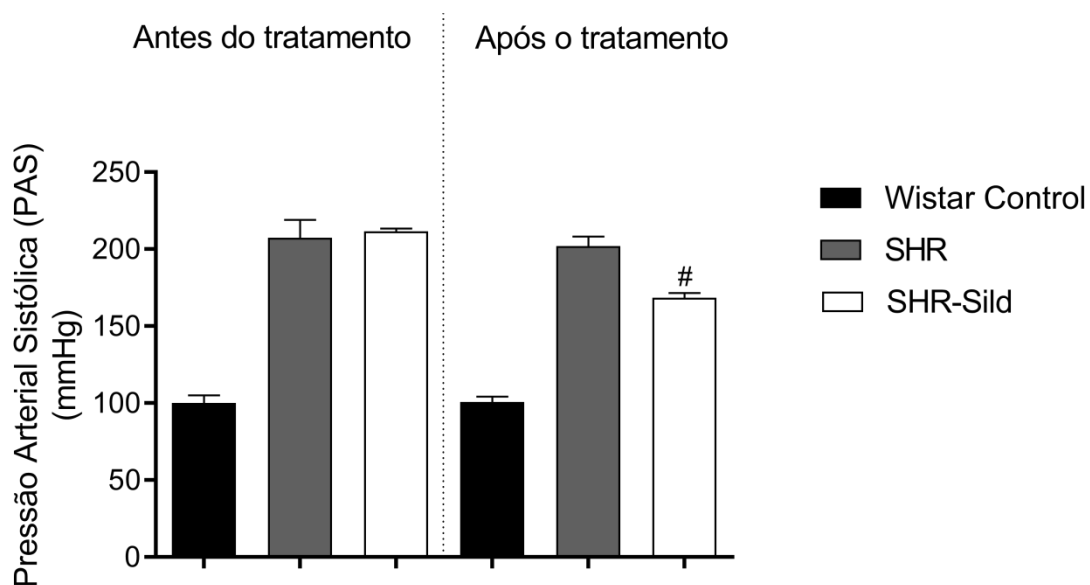


Figura 4. Análise do efeito do tratamento com sildenafil sobre a pressão arterial sistólica (PAS) em animais SHR. Os valores estão expressos como média \pm EPM. [#] $p < 0,05$ vs. Grupo antes do tratamento, ANOVA uma via.

5.2 Efeitos do sildenafil na vasoconstrição e na vasodilatação

O aumento da resposta contrátil à fenilefrina em aortas de animais SHR (Fig. 5 A), confirmou nossa hipótese que a disfunção endotelial em vasos de condutância deste modelo de hipertensão inclui o desbalanço entre componentes

vasodilatadores e vasoconstrictores. Ao analisarmos a área abaixo da curva (AUC), podemos observar que o grupo SHR exibiu um aumento neste parâmetro (35 %) e aumento na resposta máxima (30%) à fenilefrina comparado ao grupo Wistar controle, e o tratamento com sildenafil foi capaz de normalizar todos estes parâmetros. A Fig. 5B sumariza os resultados do relaxamento vascular induzido por acetilcolina em anéis aórticos dos grupos SHR e Wistar. Como mostrado no gráfico, o grupo SHR exibiu um deslocamento para a direita e para cima na curva concentração-resposta à acetilcolina quando comparado com animais Wistar controle ($p < 0,05$ vs. Wistar), indicando um comprometimento da função endotelial nos animais hipertensos. Em contraste, o relaxamento induzido por acetilcolina foi parcialmente restaurado nos SHR tratados com sildenafil. Na tabela abaixo podemos observar que animais SHR exibiram uma diminuição significativa na eficácia (R_{\max} : ~ 30%, $p < 0,05$) e área abaixo da curva (~ 100 u.a.) no relaxamento dependente do endotélio, quando comparado com ao grupo controle Wistar, e o tratamento com sildenafil foi capaz de melhorar esses parâmetros (R_{\max} : ~ 60% e AUC: ~ 229 au $p < 0,05$) como demonstrado na tabela abaixo (Fig. 5 B).

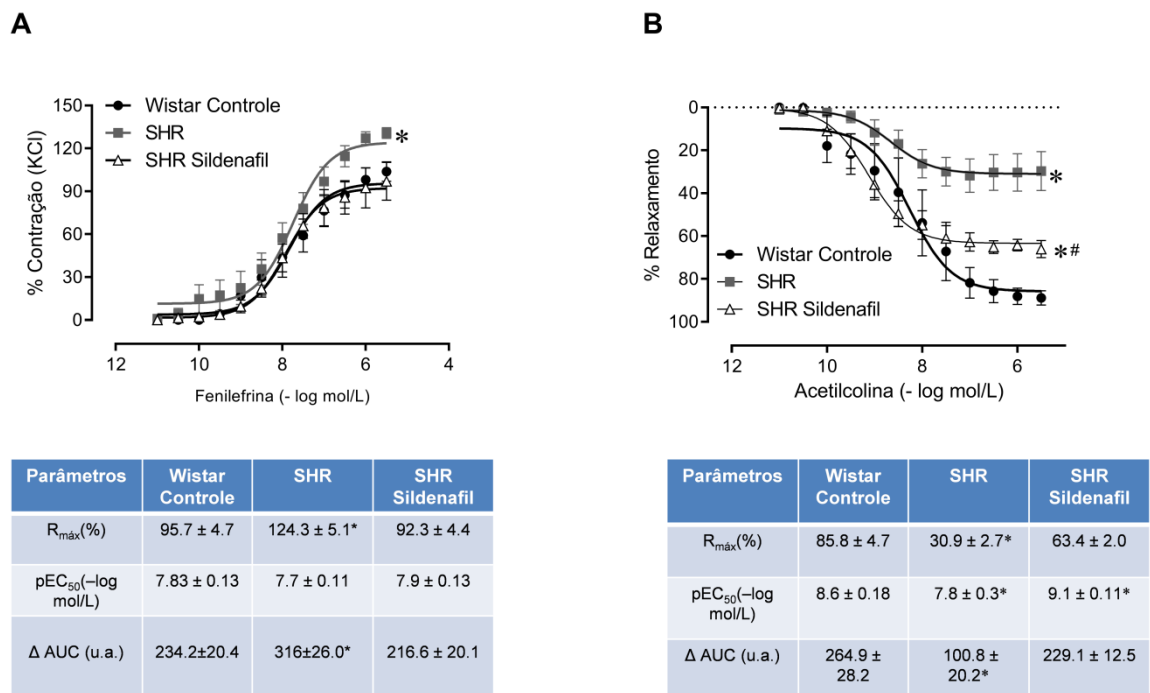


Figura 5. O efeito do tratamento com sildenafil na vasoconstricção e vasodilatação em aortas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Curva concentração-resposta de relaxamento induzido por acetilcolina (A) em anéis aórticos de Wistar e SHR tratados com

sildenafil ou veículo, e curva dose-resposta de contração induzida por fenilefrina (B) em anéis aórticos de Wistar e SHR tratados com sildenafil ou veículo. As tabelas abaixo (1) dos gráficos mostram a resposta máxima, a diferença na área sob a curva e a sensibilidade, das curvas de fenilefrina e acetilcolina. Os valores são médias \pm EPM ($n = 5-6$ animais por grupo). * $p < 0,05$ vs. grupo controle Wistar Controle, # $p < 0,05$ vs. SHR. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (gráficos) ou ANOVA uma via (tabelas)].

5.3 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do óxido nítrico

Para avaliar a participação do NO na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, anéis aórticos foram incubados com L-NAME antes das curvas concentração-resposta de ACh. Em todos os grupos, o L-NAME bloqueou a resposta vasodilatadora desencadeada pela ACh (Figura 6A). Além disso, a análise da resposta máxima e da diferença das áreas abaixo da curva (Δ AUC) revelou que a participação do NO na resposta de relaxamento à ACh foi significativamente reduzida nos animais SHR não tratados quando comparados ao Wistar Controle (-70% e -65%, respectivamente $p < 0,05$) e o tratamento com sildenafil foi capaz de promover uma melhora no relaxamento induzido por ACh em SHR quando comparado a SHR não tratado (+41% e +50% $p < 0,05$).

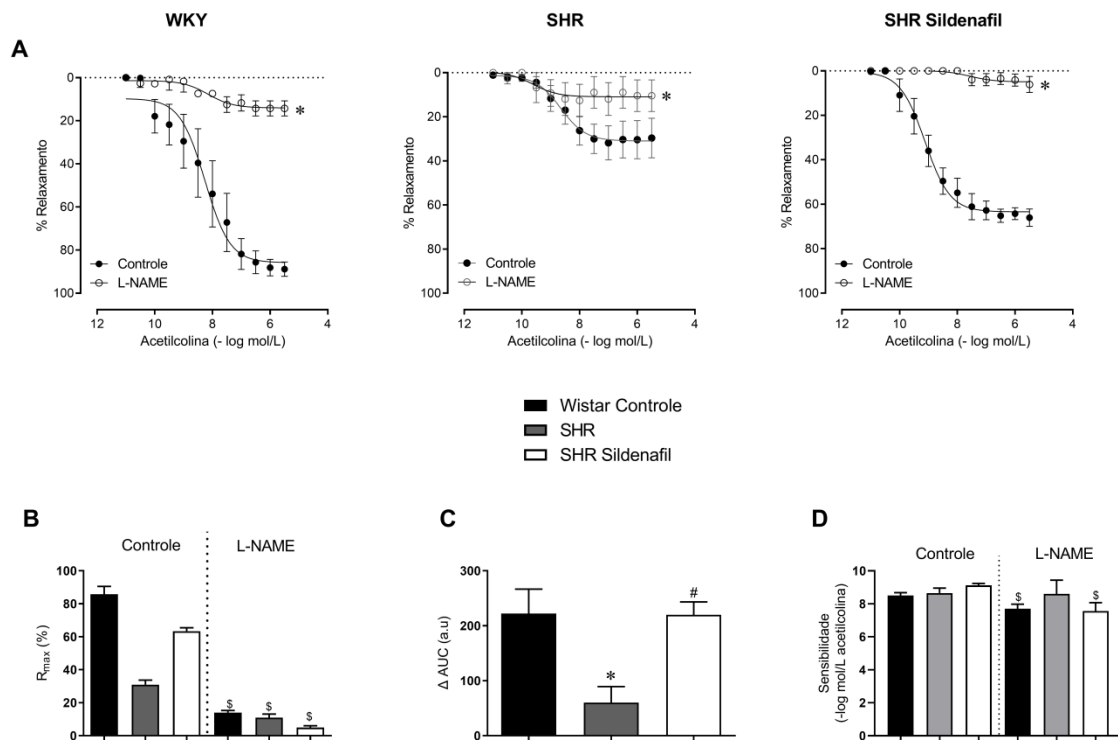


Figura 6. Efeito do sildenafil na biodisponibilidade de óxido nítrico de ratos espontaneamente hipertensos. (A) Curva concentração-resposta à acetilcolina após o bloqueio da NO sintase endotelial com L-NAME. Os gráficos de barras mostram a resposta máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de acetilcolina. Os valores estão expressos como médias \pm EPM (n = 5-6 animais por grupo). * p <0,05 vs. Wistar Controle, #p <0,05 vs. SHR e \$ p <0,05 vs. os respectivos controles sem L-NAME. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.4 Análises da biodisponibilidade de óxido nítrico vascular e plasmático

Para avaliar a produção basal de NO pelo endotélio, anéis aórticos foram incubados com L-NAME por 20 minutos e o delta de tensão basal foi medido antes e após o bloqueio. Em todos os grupos, o L-NAME promoveu aumento da tensão basal (Figura 7A), porém a magnitude do aumento no grupo SHR não tratado foi menor em comparação com controle Wistar (-65%, p <0,05) e o grupo hipertenso tratado com sildenafil obteve melhora neste parâmetro quando comparado a SHR não tratado (+ 53% p <0,05). A Figura 7B mostra os valores médios de nitrito, um metabólito estável do óxido nítrico, determinado pelo ensaio Griess em cada um dos três grupos de animais. O SHR não tratado apresentou diminuição (18%, p <0,05) no nitrito plasmático comparado ao grupo controle Wistar e o tratamento com sildenafil normalizou os níveis de nitrito plasmático.

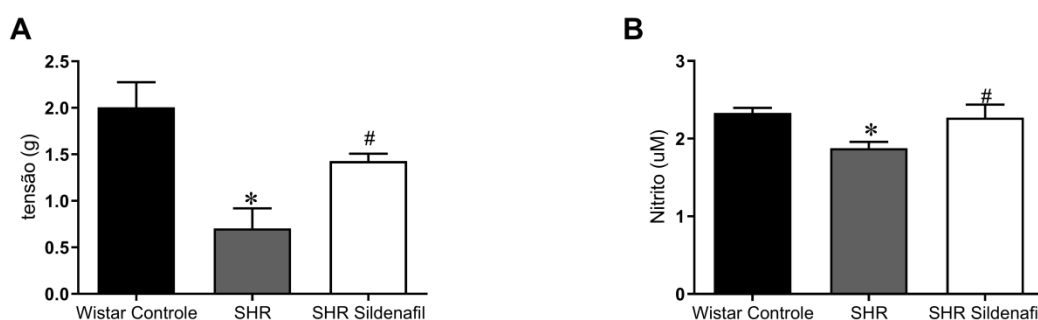


Figura 7. Contribuição do sildenafil na biodisponibilidade do óxido nítrico em SHR. Aumento da força máxima (Δ Emax) induzida por 100 μ M L-NAME (A). Níveis de nitrito, um metabólito estável de óxido nítrico (B). Os valores são expresso como médias \pm EPM. *p <0,05 vs. Wistar e #p <0,05 vs. ANOVA 1 via.

5.5 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do estresse oxidativo

A participação das ERO's na resposta de relaxamento à ACh foi avaliada pela incubação dos anéis aórticos com apocinina, um inibidor da NADPH Oxidase. Não observamos alterações significativas na reatividade vascular após o bloqueio com apocinina nos animais Wistar, indicando que as ERO's podem não participar dessas respostas (Figura 8A). No entanto, a apocinina aumentou significativamente a resposta máxima e o Δ AUC para ACh em aortas de SHR não tratados (Figura 8B e C). Em SHR tratados com sildenafil, não observamos alterações significativas na vasodilatação induzida por ACh na presença de apocinina.

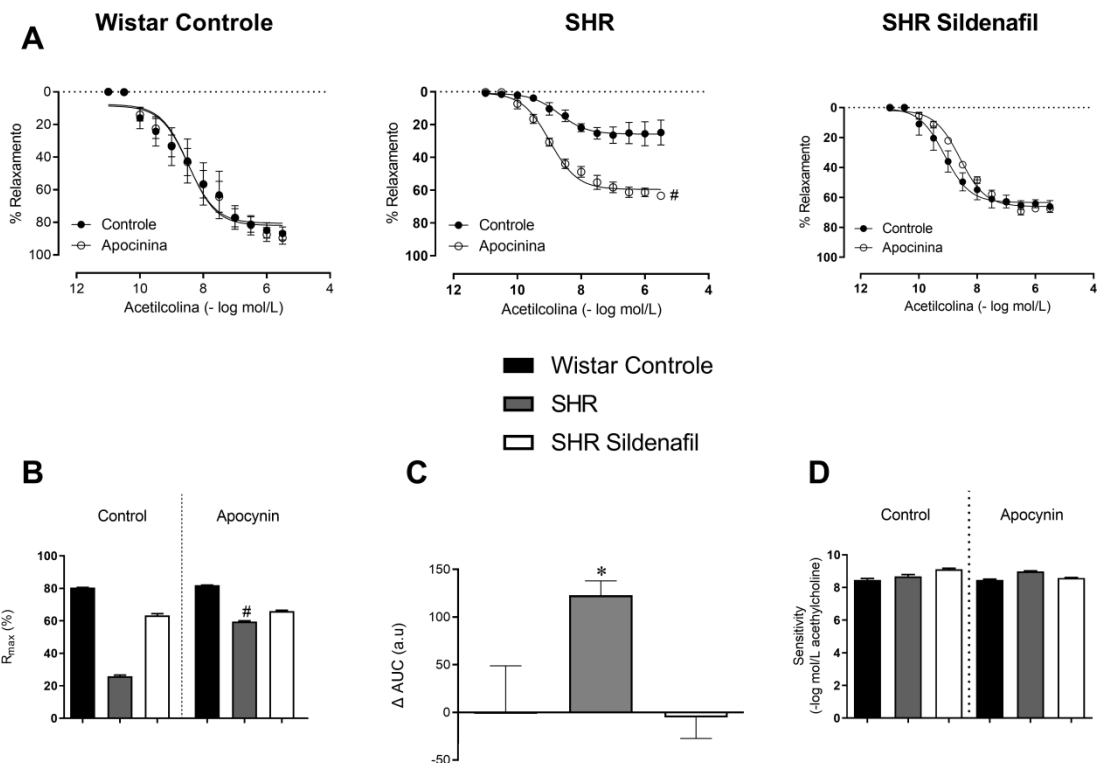


Figura 8. Contribuição das espécies reativas de oxigênio derivadas da NADPH oxidase sobre a função endotelial e o efeito do sildenafil. (A) Curva concentração-resposta à acetilcolina após o bloqueio da NADPH Oxidase com apocinina. Os gráficos em barras mostram a resposta máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de acetilcolina. Os valores estão expressos como médias \pm EPM ($n = 5-6$ animais por grupo). * $p < 0,05$ vs. Wistar Controle, # $p < 0,05$ vs. SHR e \$ $p < 0,05$ vs. os respectivos

controles sem L-NAME. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.6 Capacidade antioxidante total plasmática e peroxidação lipídica da aorta

A capacidade antioxidante total (CAT) plasmática foi realizada utilizando o método DPPH. A Figura 9A mostra os valores médios de percentagem da atividade antioxidante em relação ao grupo controle Wistar. Podemos observar que o grupo SHR não tratado não exibiu diferença na atividade antioxidante plasmática em comparação com o controle Wistar, e o tratamento com sildenafil causou aumento significativo na capacidade antioxidante total plasmática em comparação com o controle Wistar (+ 20%, $p < 0,05$). Os dados do ensaio de peroxidação lipídica da aorta determinado através da reação do malondialdeído com ácido tiobarbitúrico (TBARS) estão resumidos na Fig. 9B. TBARS foi significativamente aumentado no SHR comparado com o Wistar (110 vs 65 nmol MDA / mg proteína, $p < 0,05$). Em contraste, SHR tratado com sildenafil exibiu valores normais de TBARS (70 nmol MDA / mg de proteína).

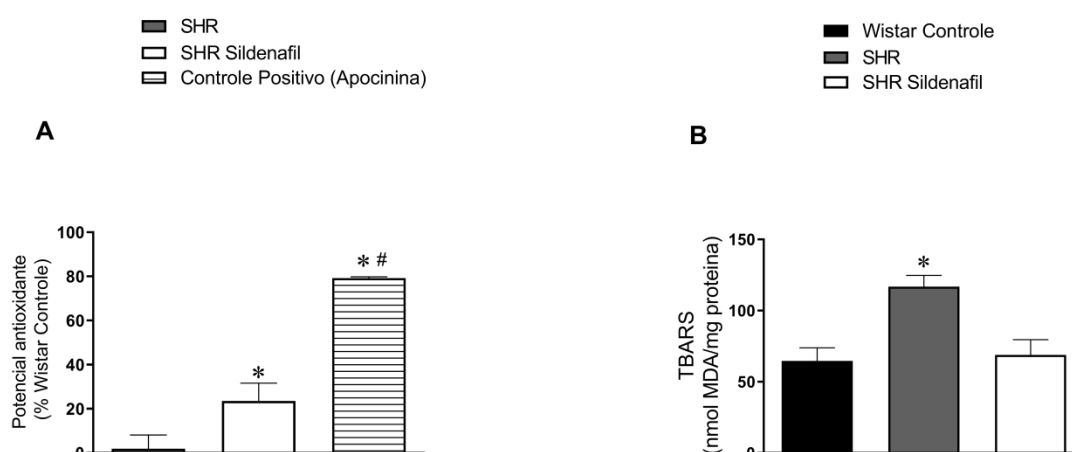


Figura 9. Efeitos do tratamento com sildenafil na capacidade antioxidante total (CAT) plasmática e na peroxidação lipídica da aorta. (A) Porcentagem de atividade antioxidante em relação ao grupo Wistar controle. (B) Níveis de MDA mensurados pelo método de

TBARS. Os valores são expressos como média \pm EPM (n = 5-6 animais por grupo). *p <0,05 vs. Wistar e #p <0,05 vs. SHR.ANOVA 1 via.

5.7 Determinação dos níveis de $\bullet\text{O}_2$ em células de sangue total

Na figura 10 observamos que os animais hipertensos apresentam um aumento da intensidade de fluorescência ao DHE em células de sangue total em comparação as células do grupo controle Wistar (cerca de 10 vezes mais) e o tratamento com sildenafil promoveu uma redução sistêmica nos níveis de superóxido. Estes dados mostram o aumento da produção de ERO's levando ao estresse oxidativo em células de aorta de animais hipertensos e o tratamento com sildenafil foi capaz de promover uma diminuição das ERO's, e conseqüentemente diminuir o estresse oxidativo nesses animais

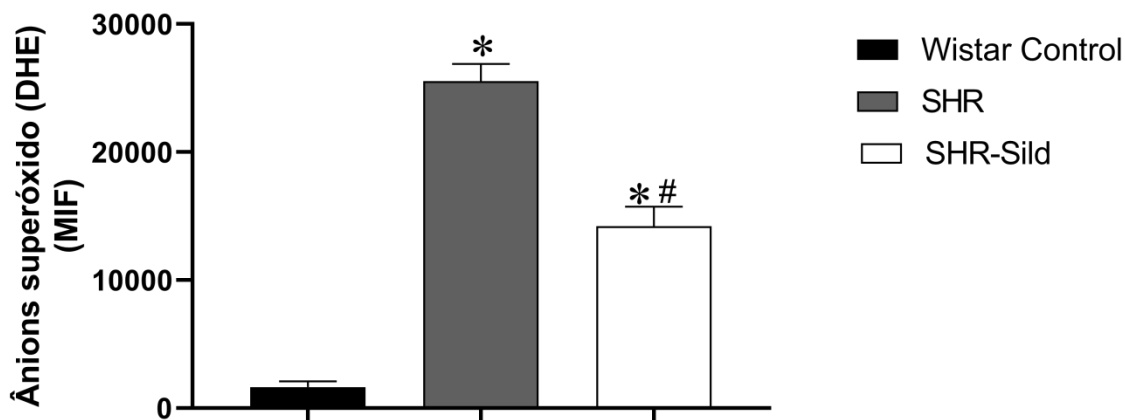


Figura 10. Avaliação da produção ROS ($\bullet\text{O}_2$ -), em células de sangue total, pela intensidade de fluorescência, emitida pelo DHE por citometria de fluxo. Os valores foram expressos em média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizado ANOVA de 1 via. *p<0.05 vs.Wistar e #p<0.05 vs.SHR

5.8 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da via do GMPc

Para avaliar a participação do GMPc nas respostas vasodilatadoras, anéis aórticos foram submetidos a vasodilatação induzida pelo sildenafil. A Fig. 6 resume

os resultados obtidos. Como mostrado no gráfico (Fig. 6A) e nos gráficos de barras (Fig. 6 B, C e D), o grupo SHR exibiu um deslocamento para a direita e para cima na curva concentração-resposta ao sildenafil quando comparado com animais controle Wistar (Rmax: ~ 50%; AUC: ~ 200 vs. Rmax: ~ 90%; AUC: ~ 300 u.a. $p < 0,05$), indicando uma diminuição da resposta de relaxamento no grupo hipertenso. Em contraste, a resposta de relaxamento induzida por GMPc foi completamente restaurada no grupo SHR tratado com sildenafil (Rmax: ~ 80% e AUC: ~ 290 u.a.).

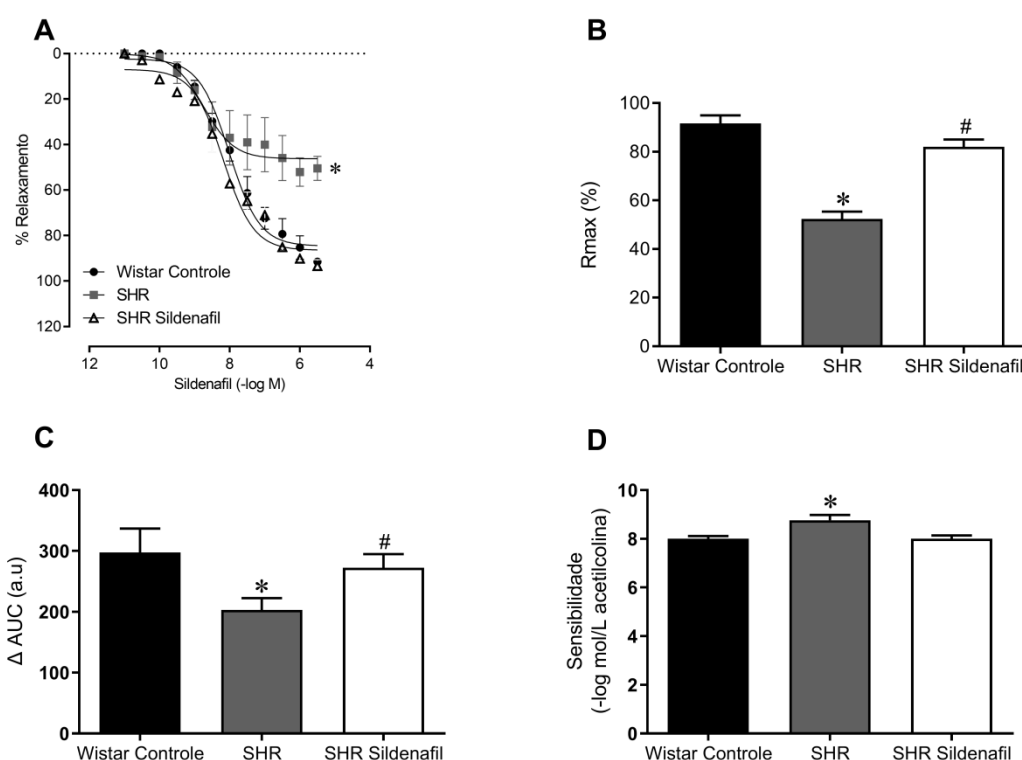


Figura 11. Contribuição da via do GMPc para a disfunção vascular em SHR tratados com sildenafil. (A) Curva concentração-resposta ao sildenafil em anéis de aorta com endotélio intacto. Os gráficos em barras mostram a resposta máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de relaxamento ao sildenafil. Os valores são médias \pm EPM ($n = 5-6$ animais por grupo). * $p < 0,05$ vs. Wistar controle, # $p < 0,05$ vs. SHR. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.9 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da via da PKG

Para avaliar a participação da PKG nas respostas vasodilatadoras, anéis aórticos foram submetidos a relaxamentos induzidos por 8-Br-GMPc. A Fig. 8 resume os resultados do relaxamento induzido por Br-cGMP em anéis de aorta dos

grupos SHR e Wistar. Como mostrado no gráfico 6A, o grupo SHR exibiu um desvio para a direita e para cima na curva de concentração-resposta à Br-cGMP quando comparado a animais Wistar controle (R_{max} : ~ 40%; AUC ~ 230 au vs. R_{max} : ~ 90% e AUC: ~ 7 au, $p < 0,05$), indicando uma redução na resposta vasodilatadora, ao contrário do grupo SHR tratado com sildenafil, que obteve restauração da resposta vasodilatadora (R_{max} : ~ 92 e AUC: 200 au).

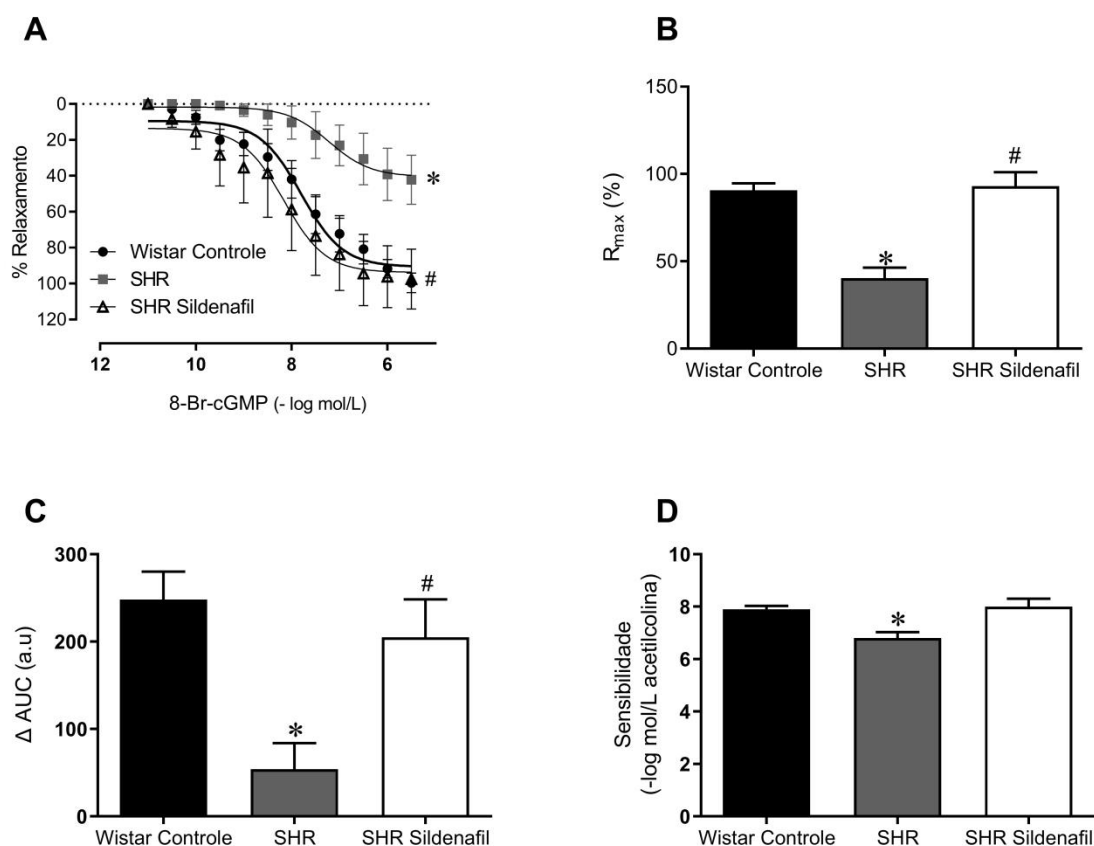


Figura 12. Contribuição da via da PKG para a disfunção vascular em SHR tratados com Sildenafil. O gráfico (A) mostra as mudanças na curva concentração-resposta ao 8-Br-cGMP, um ativador da PKG. Os gráficos de barras mostram a resposta máxima, a diferença na área sob a curva e a sensibilidade (B, C e D), a partir da curva de relaxamento ao Br-cGMP. Os valores são médias \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Wistar e # $p < 0,05$ vs. SHR [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.10 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da via da PKA

Para avaliar a participação da PKA na resposta vasodilatadora, anéis aórticos foram submetidos a relaxamentos induzidos por 8-Br-cAMP, um ativador de

PKA. A Fig. 9 resume os resultados do relaxamento induzido por Br-cAMP em anéis aórticos dos grupos SHR e Wistar. Como mostrado nos gráficos, não foi observada diferença na curva concentração-resposta para o Br-cAMP entre os três grupos experimentais.

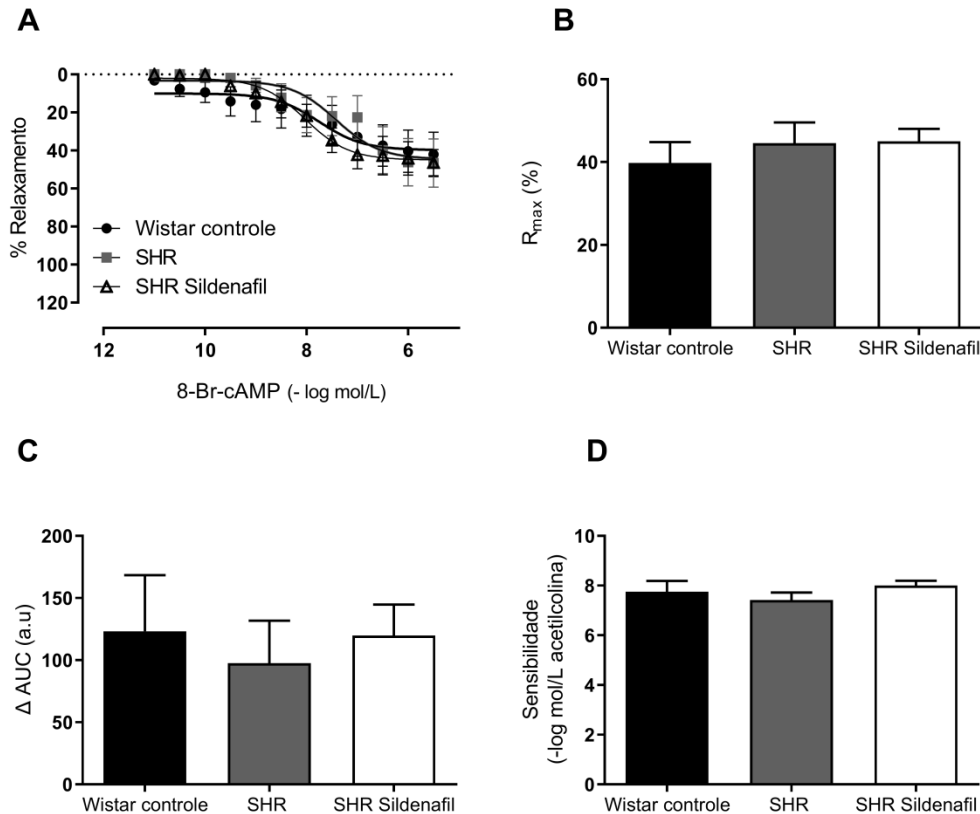


Figura 13. Contribuição da PKA para a disfunção vascular em SHR tratados com Sildenafil. O gráfico (A) mostra a curva concentração-resposta ao 8-Br-AMPC, um ativador da PKA. Os gráficos de barras mostram a resposta máxima, a diferença na área sob a curva e a sensibilidade (B, C e D), a partir da curva de relaxamento 8-Br-AMPC. Os valores são médias \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Wistar e # $p < 0,05$ vs. SHR [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.11 Efeitos do sildenafil na resposta contrátil dependente do endotélio

Para avaliar as contrações dependente do endotélio, anéis aórticos foram incubados com L-NAME antes das curvas concentração-resposta à acetilcolina sem

pré-contracção. A Fig. 14 resume os resultados da contracção dependente do endotélio induzida por acetilcolina em anéis aórticos dos grupos SHR e Wistar. Em todos os grupos, o L-NAME bloqueou a resposta vasodilatadora desencadeada pela via do NO e a acetilcolina provocou contracções dependentes do endotélio em SHR, mas não em animais Wistar controle. A análise da resposta máxima, Δ AUC e sensibilidade revelaram que a participação dos fatores de contracção do endotélio na resposta à acetilcolina foi significativamente aumentada nos SHR não tratados quando comparados ao ao grupo controle wistar e o grupo tratado com sildenafil obteve redução na contracção induzida por acetilcolina.

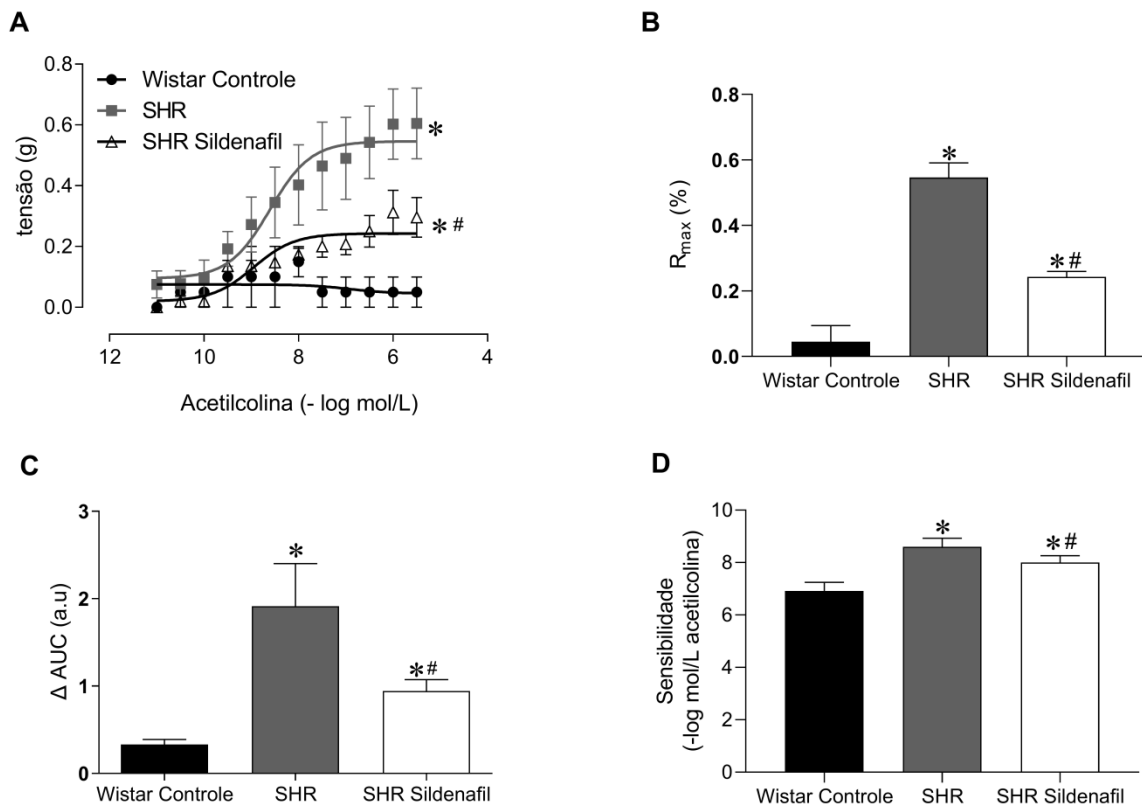


Figura 14. Avaliação da resposta contrátil dependente do endotélio em animais SHR, e o efeito do sildenafil (A) Curva concentração-resposta à acetilcolina, sem pré-contracção, após o bloqueio da NO sintase endotelial com L-NAME. Os gráficos de barras mostram a resposta máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de acetilcolina. Os valores são médias \pm EPM (n = 5-6 animais por grupo). * p < 0,05 vs. Wistar controle, #p < 0,05 vs. SHR. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.12 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel das ciclooxigenases 1 e 2 na resposta contrátil

A participação dos prostanoides derivados da Cox-1/2 na resposta de contração a phe foi avaliada pela incubação dos anéis aórticos com indometacina, um inibidor inespecífico da ciclooxigenase. Como observado na figura 11A, não houve alterações significativas na reatividade vascular após o bloqueio de indometacina nos animais Wistar controle, por outro lado, indometacina diminuiu significativamente a resposta máxima e Δ AUC à phe em aortas de SHR não tratados (Figura 11B,C e D). No entanto, em SHR tratados com sildenafil, a magnitude da redução da contração foi menor em comparação com o grupo SHR não tratado, demonstrando que o tratamento com sildenafil reduziu a participação de prostanoides na contração vascular à phe em aortas de animais hipertensos.

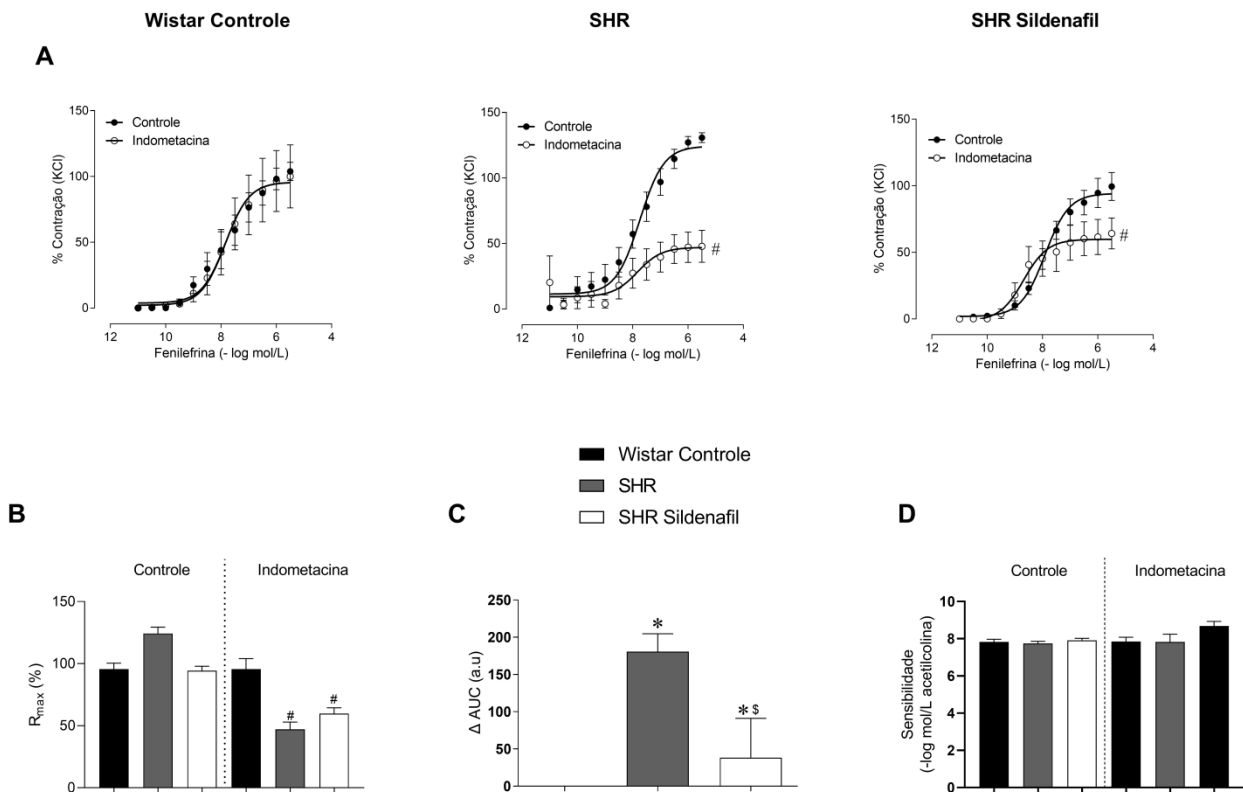
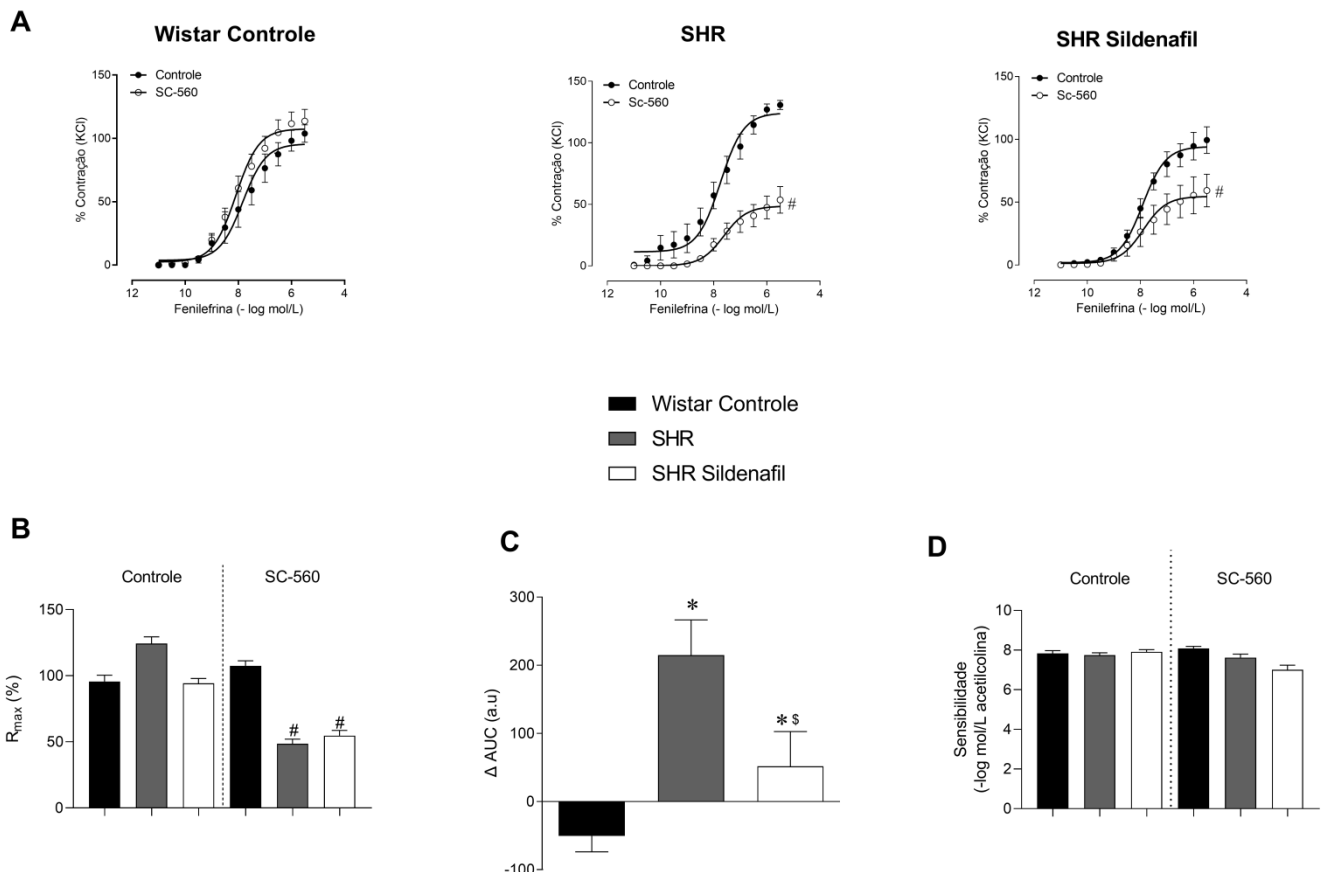


Figura 15. Papel dos prostanóides derivados da Cox1/2 na resposta contrátil de animais SHR, e o efeito do sildenafil. (A) Contração induzida por fenilefrina em anéis aórticos de SHR-sildenafil comparados ao SHR não tratado e Wistar controle após o pré-

bloqueio com indometacina. Os gráficos de barras mostram a resposta máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de fenilefrina. Os valores são expressos como médias \pm EPM (n = 5-6 animais por grupo). #p <0,05 vs. os respectivos controles sem indometacina e * p <0,05 vs. Wistar controle. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.13 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da ciclooxigenase 1 na resposta contrátil

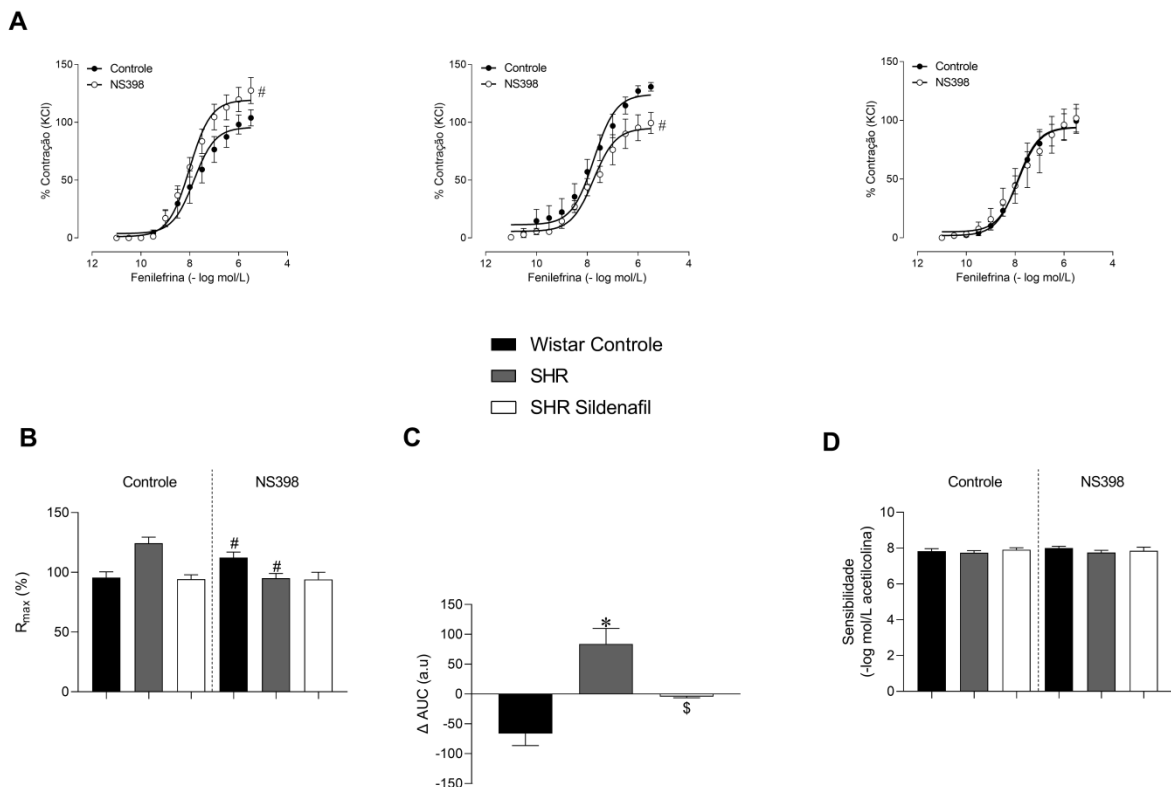
A participação dos prostanoídeos derivados da Cox-1 na resposta de contração a Phe foi avaliada pela incubação dos anéis aórticos com SC-560, um inibidor específico da ciclooxigenase-1. Como observado na figura 12A, não houve alterações significativas na reatividade vascular após o bloqueio com SC-560 nos animais wistar controle, por outro lado, o bloqueio da Cox-1 diminuiu significativamente a resposta máxima e Δ AUC à Phe em aortas de SHR não tratado. No entanto, em SHR tratados com sildenafil, a magnitude da redução da contração foi menor em comparação com SHR não tratado (Figura 12, B e C), demonstrando que o tratamento com sildenafil reduziu a participação dos prostanoídeos derivados da Cox-1 na contração vascular à fenilefrina em aortas de animais hipertensos.



(D), a partir das curvas de fenilefrina. Os valores são expressos como médias \pm EPM ($n = 5-6$ animais por grupo). # $p < 0,05$ vs. os respectivos controles sem sc-560, * $p < 0,05$ vs. Wistar controle e \$ $p < 0,05$ vs. SHR [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.14 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel da ciclooxigenase 2 na resposta contrátil

A participação dos prostanoídeos derivados da Cox-2 na resposta de contração a Phe foi avaliada pela incubação dos anéis aórticos com ns-398, um inibidor específico da ciclooxigenase-2. Como observado na figura 17A, após o bloqueio do NS-398 em animais Wistar, observou-se um pequeno aumento na resposta de contração à fenilefrina, demonstrada pela análise da resposta máxima e Δ AUC. Por outro lado, o bloqueio de Cox-2 diminuiu de forma significativa a resposta máxima e Δ AUC a Phe em aortas de SHR não tratados (Figura 17A, B e C). No entanto, em SHR tratados com sildenafil não foram observadas alterações significativas na reatividade vascular após o bloqueio de Cox-2.



e
s

curvas de SHR Sildenafil comparadas ao SHR não tratado e Wistar controle após o pró-

bloqueio com ns-398. Os gráficos de barras mostram a resposta máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de fenilefrina. Os valores são expressos como médias \pm EPM (n = 5-6 animais por grupo). #p <0,05 vs. os respectivos controles sem ns-398, * p <0,05 vs. Wistar controle e \$ p <0,05 vs. SHR [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.15 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do tromboxano A2 na resposta contrátil

A participação do tromboxano A2 na resposta de contração a Phe foi avaliada pela incubação de anéis aórticos com furegrelato, um inibidor específico da tromboxano sintetase. Após o bloqueio da tromboxano sintase nos três grupos animais, não foram observadas alterações na reatividade vascular (apenas uma leve tendência), demonstrando que o tromboxano A2 pode não estar envolvido na hiperresponsividade vascular à fenilefrina em aortas de animais hipertensos, pelo menos em aortas de SHR nessa idade.

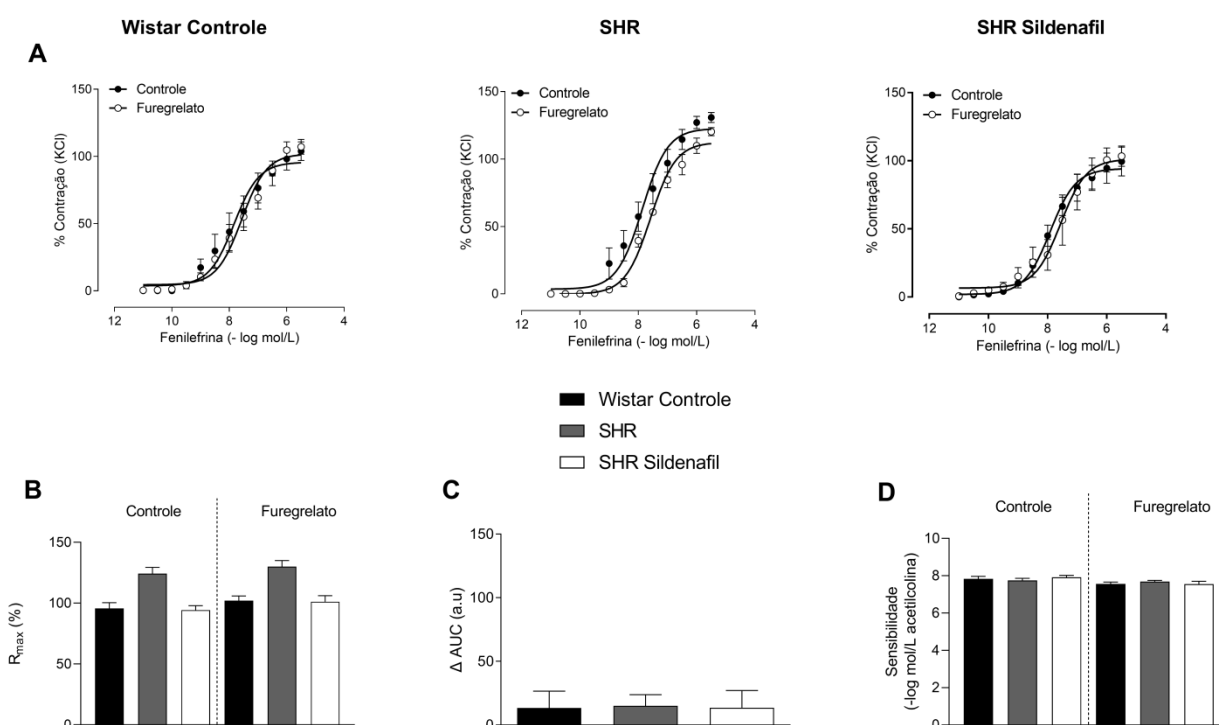
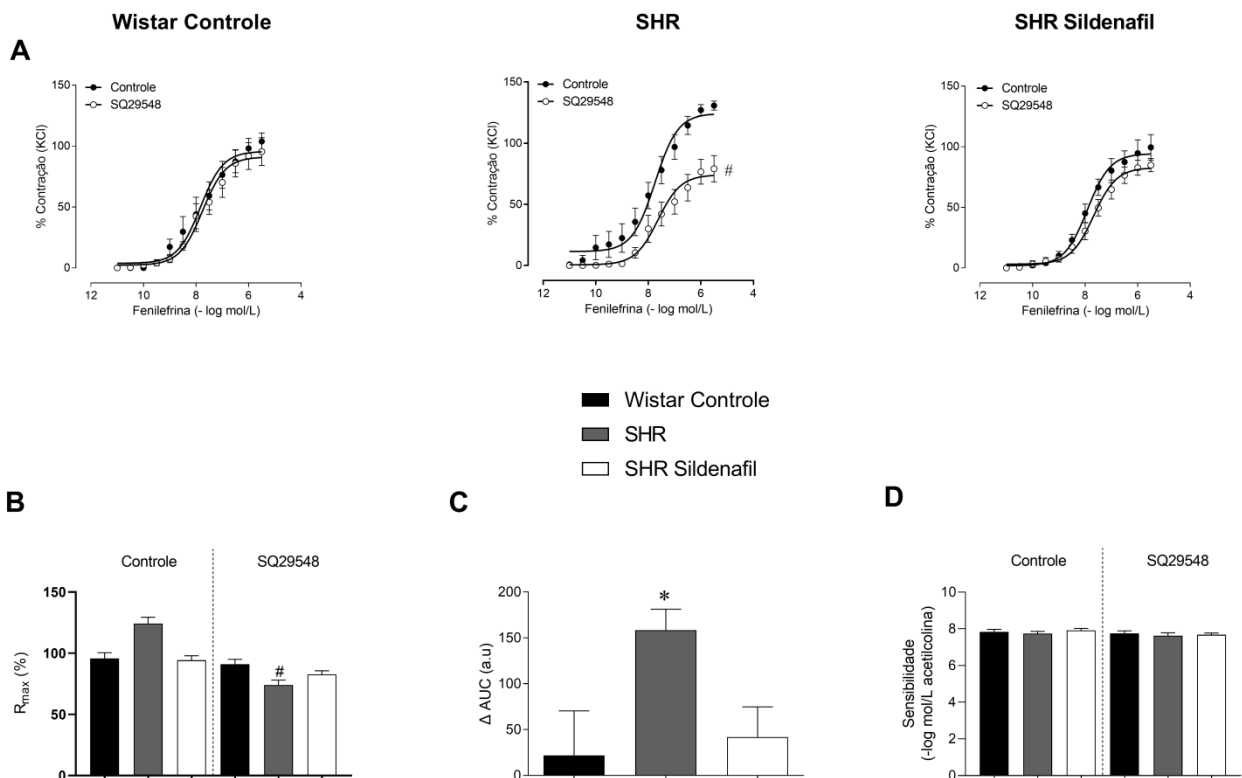


Figura 18. Papel do tromboxano A2 na resposta contrátil de animais SHR, e o efeito do sildenafil. (A) Contração induzida por fenilefrina em anéis aórticos de SHR-sildenafil comparados ao SHR não tratado e Wistar controle após o pré-bloqueio com furegrelato, um inibidor específico da tromboxano A2 sintase. Os gráficos de barras mostram a resposta

máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de fenilefrina. Os valores são expressos como médias \pm EPM ($n = 5-6$ animais por grupo). # $p < 0,05$ vs. os respectivos controles sem furegrelato e * $p < 0,05$ vs. Wistar controle. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.16 Mecanismos de disfunção vascular no SHR: o papel do receptor de tromboxano A2 na resposta contrátil

A participação do receptor de tromboxane A2 (receptor TP) na resposta de contração a Phe foi avaliada pela incubação dos anéis aórticos com SQ29548, um antagonista específico do receptor de tromboxane A2. Após o bloqueio do receptor TP em aorta de animais Wistar controle, não foram observadas alterações na resposta vascular à fenilefrina. Por outro lado, o bloqueio do receptor TP diminuiu significativamente a contração a resposta máxima e Δ AUC à Phe em aortas de SHR não tratados (Figura 19A, B e C). No entanto, o grupo SHR tratado com sildenafil não obteve alterações significativas na reatividade vascular após o bloqueio do receptor TP.

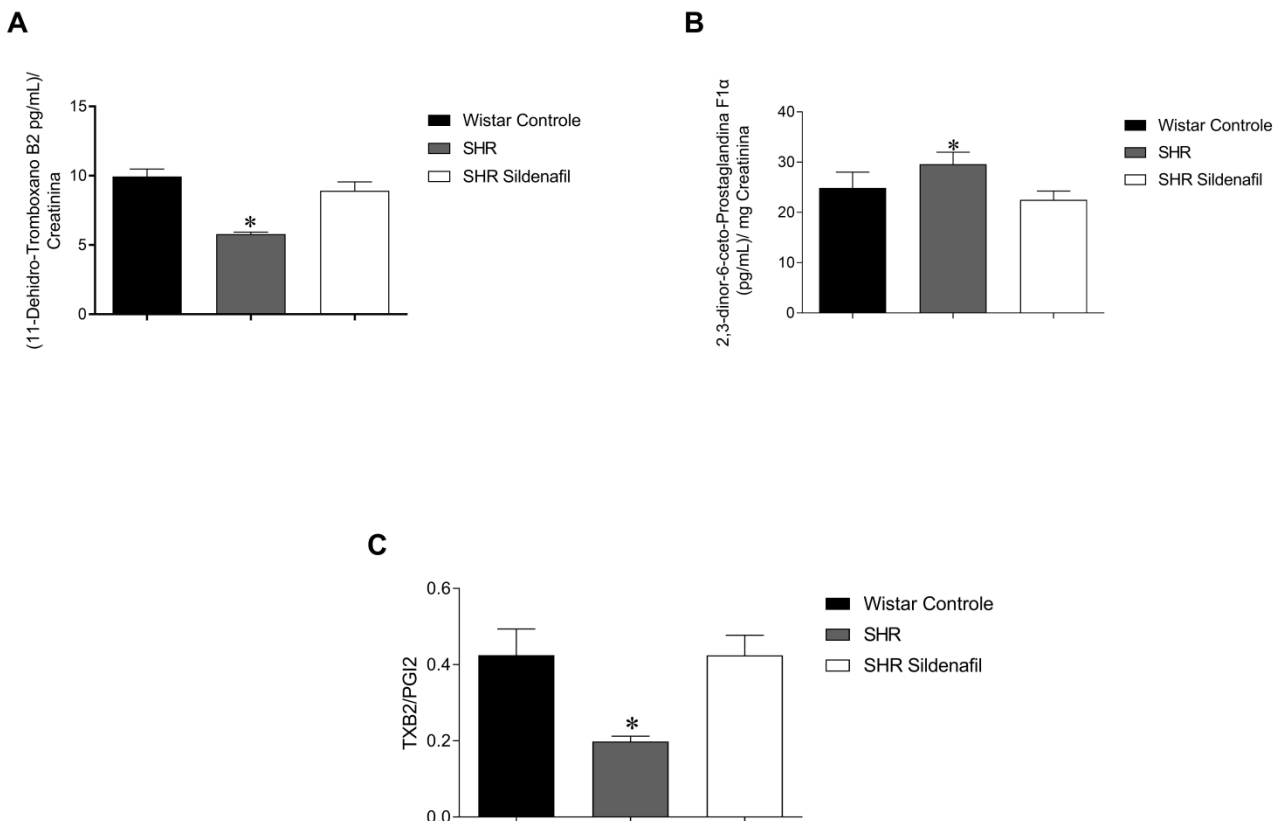


sildenafil comparados ao SHR não tratado e wistar controle após o pré-bloqueio com SQ29548, um inibidor específico do receptor TP de tromboxano A2. Os gráficos de barras

mostram a resposta máxima (B), Δ AUC (C) e sensibilidade (D), a partir das curvas de fenilefrina. Os valores são expressos como médias \pm EPM (n = 5-6 animais por grupo). #p <0,05 vs. os respectivos controles sem SQ29548 e * p <0,05 vs. Wistar controle. [ANOVA 2 vias para medidas repetidas (A) ou ANOVA 1 via (B, C e D)].

5.17 Análise dos níveis urinários de prostanóides em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)

A Figura 20 mostra os valores médios dos metaólitos urinários estáveis de tromboxano A2 e prostacilcina, determinados pelo método de elisa. Como mostrado abaixo, o grupo SHR não tratado exibiu uma diminuição (50%) nos níveis urinários de 11-desidro tromboxano b2, metabólito estável de tromboxano A2, e aumento (25 %) nos níveis urinários de 2,3-dinor-6-ceto-prostaglandina F1 alfa, em comparação com o grupo controle Wistar (Figura 20, A e B) e o tratamento com sildenafil restabelece os níveis urinários desses prostanóides a valores próximos do normal. Na figura 20C, podemos observar que relação TXa2 /PGI2 está diminuída no SHR não tratado em comparação ao controle wistar, e o tratamento com sildenafil normaliza este parâmetro no grupo hipertenso.



mostra a relação entre os níveis TXB2 e PGI2. Os valores são expressos como médias \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Wistar e # $p < 0,05$ vs. SHR ANOVA 1 VIA (A,B e C)].

5.18 Recrutamento de células progenitoras endoteliais circulantes

A análise de citometria de fluxo da CPE foi realizada com sangue periférico de ratos Wistar, SHR e SHR tratados com sildenafil, conforme mostrado em 21A. A análise dos dados revelou que a fração de células CD117 + / CD31 + duplamente positivas no sangue periférico foi significativamente aumentada no SHR (+ 57% $p < 0,05$), em comparação com o grupo Wistar e a administração de sildenafil foi capaz de diminuir os níveis de CPE circulante (40% $p < 0,05$).

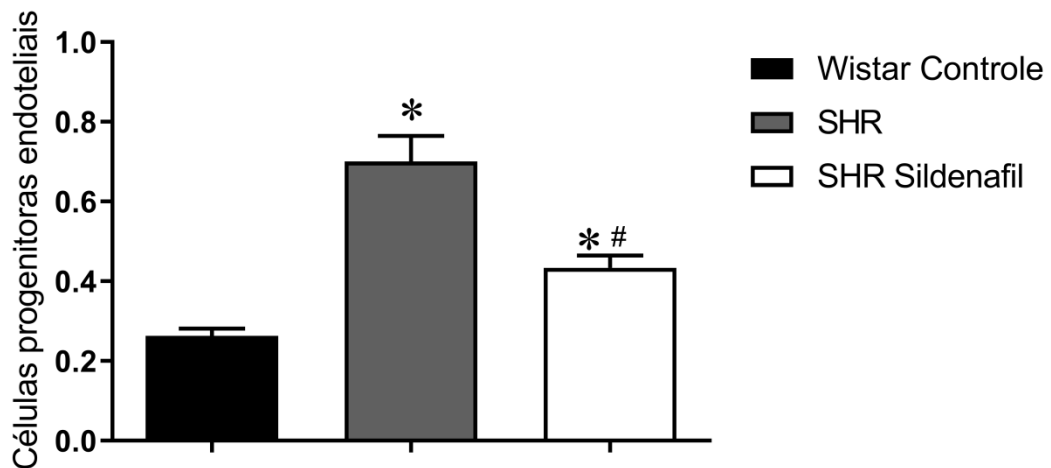


Figura 21. Efeito do sildenafil no recrutamento de células progenitoras endoteliais circulantes em SHR. Os gráficos mostram o número de células progenitoras endoteliais medidas por citometria de fluxo comparando o grupos SHR-sildenafil ao SHR e Wistar não tratados.

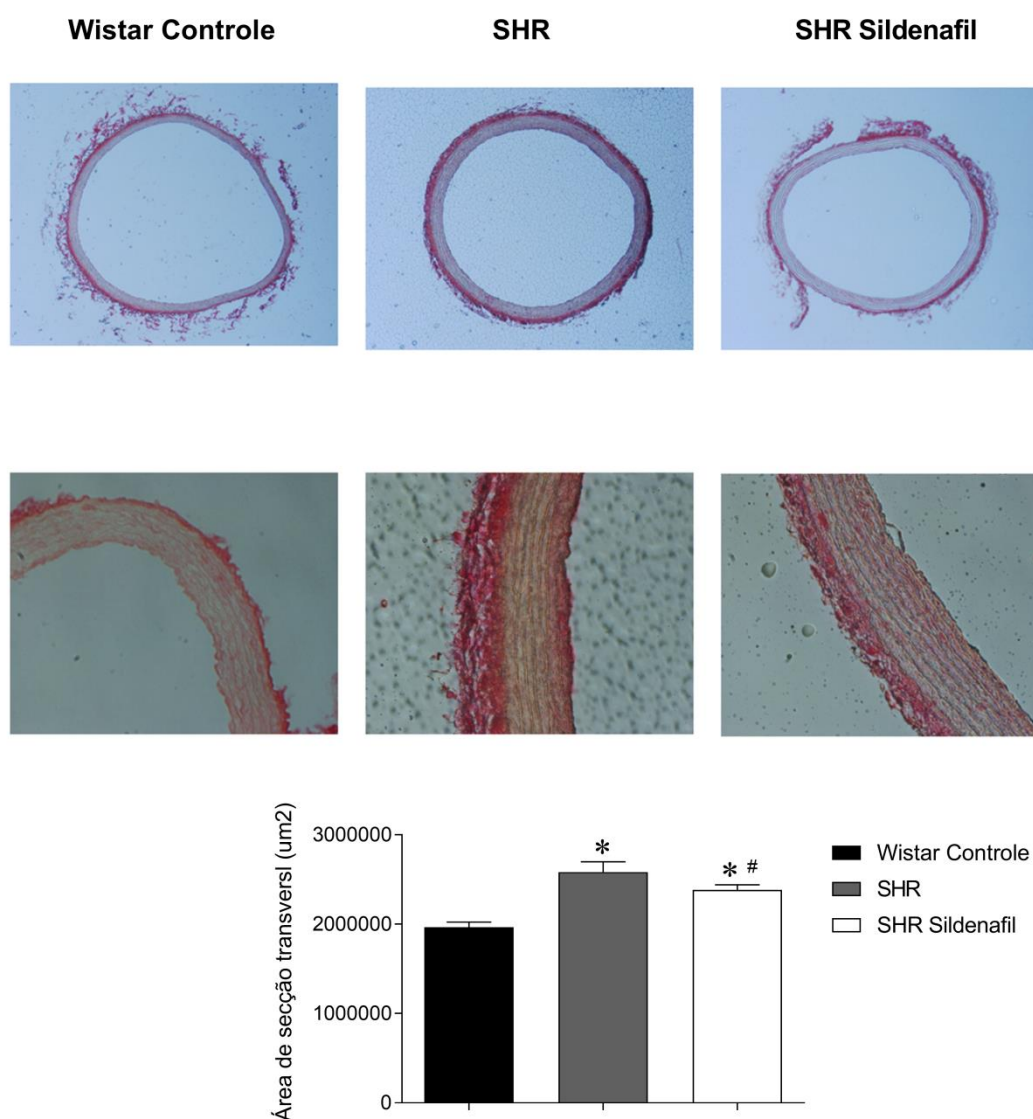


Figura 22. Avaliação da seção transversal da parede vascular. Cortes transversais de aorta, respectivamente. Gráfico de barras da área de seção transversal da parede vascular. Os dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Wistar e # $p < 0,05$ vs. SHR ANOVA 1 VIA .

5.19 Análise por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura da camada endotelial vascular

Considerando a magnitude do dano funcional observado através do teste vascular de relaxamento dependente do endotélio nos SHR, utilizamos alguns animais de cada grupo para avaliar os danos à arquitetura da superfície endotelial. As micrografias eletrônicas de varredura (Fig. 19) das aortas torácicas dos animais

Wistar mostraram uma camada de células endoteliais confluentes. Em contraste, animais do grupo SHR exibiram um dano endotelial luminal claro demonstrado por presença de muitas lacunas superficiais. Outro achado importante foi que o grupo SHR tratado com sildenafil exibiu melhora na arquitetura endotelial, com presença de poucas lacunas na superfície endotelial.

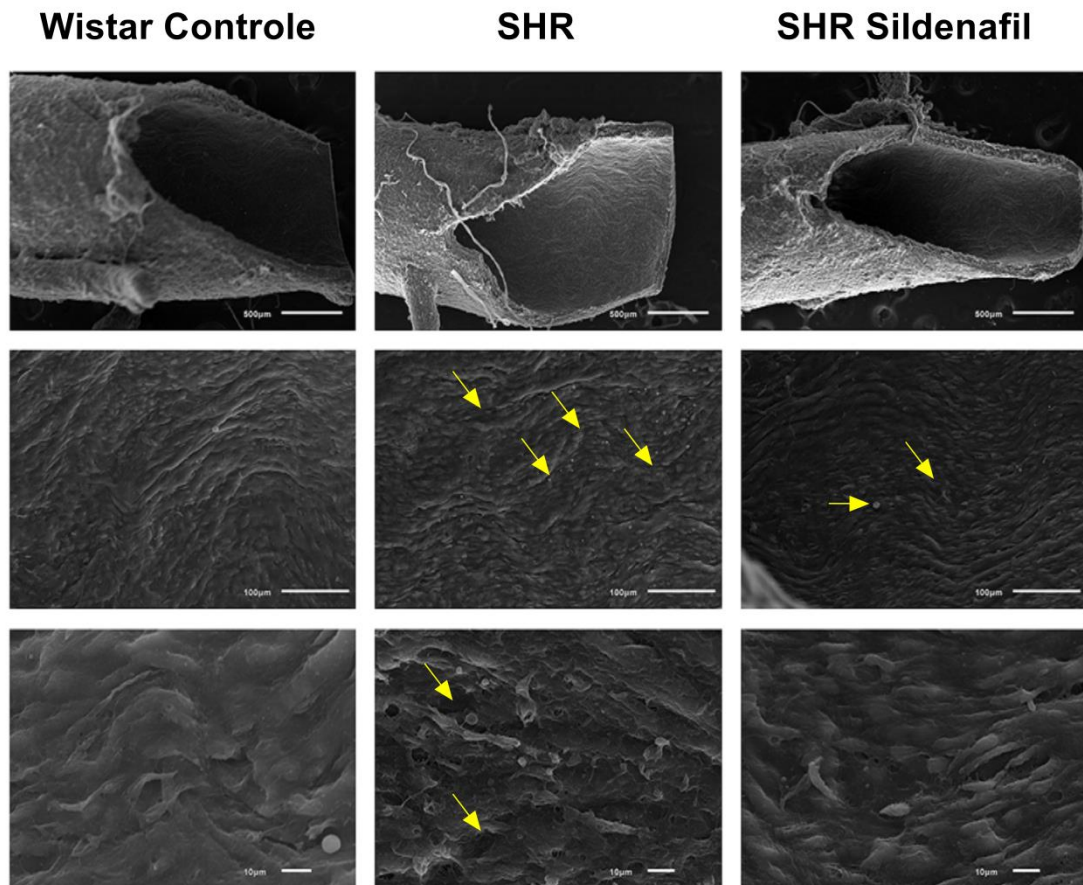


Figura 23. Efeito do sildenafil na arquitetura endotelial da superfície vascular de SHR. Microscopia eletrônica de varredura mostrando estrutura endotelial representativa de aortas de um rato Wistar normotenso, um SHR não tratado e um SHR tratado com sildenafil. Barra de escala 10 µm.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenhado para investigar os efeitos do inibidor da fosfodiesterase-5, sildenafil, na disfunção vascular de animais espontaneamente hipertensos. Nossos resultados demonstraram efeitos benéficos do tratamento crônico com sildenafil em animais SHR. Usando a técnica de reatividade vascular em anéis aórticos, observamos uma resposta de relaxamento deficiente à Ach (hiporresponsividade) e aumento da resposta à fenilefrina (hiperresponsividade) no grupo SHR, que foi causada principalmente devido a um desbalanço nas vias NO-GMPc-PKG/ERO's, aumento na ativação do eixo Cox-1/PGI2/receptor TP, e acompanhada por alteração morfológica vascular e dano à camada superficial endotelial. O presente estudo também mostra que a administração do sildenafil causou diminuição da PAS, melhora significativa da função vasodilatadora dependente do endotélio demonstrada por aumento no relaxamento induzido por acetilcolina, e diminuição da hipercontratibilidade à fenilefrina em ratos espontaneamente hipertensos. Portanto, nossos dados fornecem uma demonstração clara de que o mecanismo central para o efeito benéfico do sildenafil envolve reparo na morfologia vascular, arquitetura endotelial, redução do estresse oxidativo, melhora no balanço entre prostanóides vasoconstrictores e vasodilatadores, aumento da biodisponibilidade de NO e melhoria da sinalização de GMPc e proteína kinase G.

Como esperado, observamos aumento da PAS em animais do grupo SHR, demonstrado em vários trabalhos na literatura. No entanto, o tratamento por três semanas com sildenafil, reduziu em aproximadamente 15 % a pressão arterial de animais hipertensos. Somado a isso, observamos disfunção endotelial acentuada em aortas de animais SHR, assim demonstrado anteriormente por nós e outros grupos de pesquisa em artérias de condutância e resistência. Também mostramos que a disfunção endotelial está relacionada à menor participação do NO na resposta vasodilatadora à acetilcolina, evidenciada pela diminuição da diferença da área sob a curva concentração-resposta à ach quando bloqueada com L-NAME, o que está de acordo com outros estudos. Além disso, encontramos redução na produção basal de NO em aorta de SHR, que também foi demonstrada em modelo animal de

hipertensão, e clinicamente em fumantes e paciente com insuficiência cardíaca crônica (43, 66-69). O NO é crucial para a manutenção da pressão arterial normal e, portanto, sua relação com a hipertensão essencial tem sido objeto de intensa investigação. Diversos estudos demonstraram o comprometimento da vasodilatação mediada por NO em artérias braquiais, coronárias e artérias renais de pacientes com hipertensão essencial comparados a normotensos. A razão para redução da vasodilatação dependente do NO não é totalmente clara. Vários estudos demonstraram que a disfunção endotelial na hipertensão essencial está associada a uma redução da via de sinalização do NO, embora não esteja claro se isso representa síntese reduzida ou aumento de sua degradação; clinicamente, indivíduos hipertensos apresentam respostas vasculares prejudicadas à acetilcolina, mas respostas normais à estimulação b-adrenérgica (70-72). Esses achados sugerem que a disfunção endotelial associada à hipertensão essencial se deve a uma anormalidade seletiva das vias de sinalização que levam à ativação da NOS.

A deficiência de NO na hipertensão tem sido associada a mecanismos dependentes do estresse oxidativo, devido sua inativação por espécies reativas de oxigênio por fontes como NADPH oxidase (NOX), mitocôndrias, eNOS desacoplada e xantina oxidase (XO). Em muitas patologias vasculares, um desbalanço entre a produção e inativação de NO por espécies reativas de oxigênio, leva a uma aparente redução na biodisponibilidade de NO, levando a perda de sinalização do NO. Atualmente, acredita-se que o principal mecanismo para a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico seja a reação deste com o ânion superóxido (O_2^-). Fisiologicamente, o O_2^- é biotransformado pela enzima superóxido dismutase (SOD) a H_2O_2 e, eventualmente, este ao sofrer ação da catalase, gera água e oxigênio, evitando assim sua interação com o NO. No entanto, se os níveis de O_2^- aumentarem o suficiente, o NO é capaz de reagir facilmente com o superóxido, causando sua inativação química (73-77).

No presente estudo, a melhora no relaxamento vascular dependente do endotélio em animais hipertensos tratados com sildenafil pode ser explicada pelo fato de que essa droga exerce efeito protetor contra o estresse oxidativo e aumenta os sistemas enzimáticos antioxidantes, como foi observado por nós e por outros grupos de pesquisa. Aqui fornecemos evidências adicionais de que o sildenafil exerce propriedades antioxidantes, ao demonstrarmos que animais hipertensos

apresentavam níveis aumentados de peroxidação lipídica na aorta em comparação ao grupo controle, mas o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir este marcador de estresse oxidativo tecidual. Somado a isso, já é sabido que a NADPH oxidase, uma importante fonte de ERO's, contribui para o estresse oxidativo em animais SHR, pois sua inibição promove a melhora no relaxamento induzido por ach como mostrado em estudos prévios (78,79). No presente estudo verificamos que o tratamento com sildenafil restaura a função endotelial em SHR ao promover redução do estresse oxidativo, evidenciada pelo aumento da diferença da área sob a curva concentração-resposta à ach em presença de apocinina (inibidor da NADPH Oxidase) o que está de acordo com outros estudos. O resultado obtido pode ser explicado pelo efeito do sildenafil em aumentar os níveis intracelulares de GMPc, o qual promove redução na expressão/atividade da NADPH oxidase, diminuindo assim os níveis de $\bullet O_2$ - e restaurando parte da biodisponibilidade de NO. Somado a isso, nossos dados obtidos por meio do protocolo de DPPH demonstram que o tratamento com sildenafil aumenta a capacidade antioxidante plasmática total (CAT) em animais hipertensos. Isto pode ser explicado pelo efeito do sildenafil em aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e catalase, como sugerido por outros autores. Além do aumento dos níveis de ERO's, o aumento da atividade das fosfodiesterases (PDE's) nas células musculares lisas vasculares pode ser uma causa importante de disfunção vascular, a qual é caracterizada por aumento da resposta vasoconstritora e redução da vasodilatação dependente do endotélio (80-84). Recentemente, Stegbauer J e colaboradores, demonstraram que disfunção vascular na hipertensão renovascular estava associada a uma maior degradação de GMPc devido o aumento da expressão de PDE-5, e que a e que a inibição da PDE5 pelo sildenafil foi capaz de normalizar a função vascular em artérias mesentéricas e aumentar o conteúdo renal de GMPc. A eficácia do sildenafil em melhorar a resposta vasodilatadora à ach foi demonstrada em modelos de hipertensão renovascular, aterosclerótica e diabética; Além disso, outros autores demonstraram que o sildenafil pode regular positivamente a atividade e expressão da eNOS, o que poderia explicar, em parte, a melhora da função endotelial (85,86). O presente estudo demonstrou que o tratamento com sildenafil durante três semanas melhorou a função vascular de ratos espontaneamente hipertensos. A melhora nas respostas à ach pode ser explicada pelos mecanismos abordados acima, que podem resultar em aumento da produção de NO, o que

contribuiu para a melhora da função endotelial. A concentração aumentada de nitrito plasmático observada neste estudo, em ratos tratados com sildenafil confirma esta hipótese.

Ao prosseguirmos a investigação, observamos acentuado comprometimento na vasodilatação à curva concentração-resposta ao inibidor da PDE-5 nos animais hipertensos, evidenciada pela diminuição da diferença da área sob a curva concentração-resposta. No entanto, o tratamento com sildenafil por três semanas normalizou o relaxamento vascular induzido pelo inibidor PDE-5 em animais SHR, demonstrando que o sildenafil restaurou a via GCs / GMPc em ratos hipertensos. Alguns grupos de pesquisa sugerem que a diminuição da atividade da guanilato ciclase solúvel (GCs) em aortas de animais hipertensos pode preceder a redução de seus níveis proteicos, porque foi encontrada disfunção vasodilatadora em animais SHR, apesar dos níveis inalterados da guanilato ciclase solúvel. Também nas células musculares lisas de SHR, os níveis de GMPc assim como a expressão e atividade de GCs, sofrem redução a medida que os animais envelhecem. Outra explicação para a função anormal da sinalização GCs / GMPc é o estresse oxidativo. Na presença de excesso de ERO's, a função enzimática da GCs pode ser alterada por: a) conversão de GCs em um estado insensível ao NO, por oxidação do grupo heme protético associado a subunidade $\beta 1$; b) diminuição da atividade da GCs causada pelo peroxinitrito (ONOO-); c) modificação pós translacional mediada pelo peroxinitrito das subunidades da guanilato ciclase (87-89). Como mencionado acima, nosso estudo demonstra que o tratamento com sildenafil por três semanas, melhora a sinalização GCs / GMPc, antes prejudicada, em animais hipertensos. Nossa sugestão é que o sildenafil aumente a sensibilidade da sinalização GCs/GMPc devido os efeitos antioxidantes e prevenção da inativação da guanilato ciclase por espécies reativas de oxigênio.

O relaxamento do músculo liso vascular é promovido por meio de vias dependentes de GMPc ou AMPc, que ativa as proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos,consequentemente, respostas deficientes a vasodilatadores na hipertensão podem refletir anormalidades subjacentes envolvendo vias de sinalização intracelular relacionada a nucleotídeos cíclicos. A proteína quinase cíclica dependente de GMPc (PKG) e a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) são serina/treonina quinases e exercem seus efeitos ao fosforilar várias proteínas-

alvo, que com diferentes mecanismos modulam a contratilidade e o relaxamento do músculo liso vascular. Em nosso estudo, as respostas das aortas à ativação direta da proteína quinase dependente de AMP, pelo 8-bromo-cAMP foram semelhantes entre os grupos experimentais estudados, mostrando que a PKA não desempenha papel relevante na disfunção vascular, em aortas, de ratos espontaneamente hipertensos (90-93). Este resultado corrobora com estudos mostrando que em ratos com hipertensão renovascular não há alteração na resposta de relaxamento ao ativador da proteína kinase A, 8-bromo-cAMP, e nenhuma alteração na expressão de PKA em aortas de SHR em comparação ao controle Wistar (94). Por outro lado, nosso estudo mostrou que o relaxamento de aortas dependente da proteína quinase dependente de GMPc, pelo 8-bromo-GMPc foram prejudicadas no grupo hipertenso, demonstrando que a PKG desempenha um papel fundamental na disfunção vascular, como foi demonstrado por outros grupos, e o tratamento com sildenafil normaliza esta via de sinalização. Portanto, nossos dados mostram que a via do óxido nítrico / GCs / GMP cíclico/ PKG está fortemente comprometida em aortas de animais SHR, e o tratamento com sildenafil é capaz de restaurá-la.

Ao continuarmos a investigação vascular, observamos que a disfunção vascular encontrada no modelo SHR de hipertensão foi caracterizada por uma responsividade contrátil aumentada que foi acentuadamente atenuada pelo tratamento com sildenafil. Especificamente, observamos uma hipercontratilidade nos anéis aórticos de SHR à fenilefrina, o que está de acordo com dados prévios da literatura, e que sugerem que a resposta contrátil vascular exacerbada aos agonistas dos adrenoreceptores α_1 , observada no modelo, pode ser mediada pelo desequilíbrio entre vias as de prostanoídes vasodilatadores e vasoconstritores. Também foi sugerido que essa resposta exacerbada à fenilefrina (R_{max}) se deve a concentração elevada de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]$ nas células musculares lisas vasculares (CMLV) de animais hipertensos. Por conseguinte, é estabelecido que prostanoídes pró-inflamatórios derivados das ciclooxygenases (cox) desempenham papel fundamental na geração e manutenção de disfunção endotelial na hipertensão. Cox-1 e cox-2 convertem o ácido araquidônico em prostanoídes vasoativos finais, sendo os principais PGI₂ e TXA₂, que possuem ações equilibradas no sentido de regular a função vascular. Em geral, a cox-1 é constitutivamente expressa na maioria dos

tecidos, enquanto a cox-2 é uma isoforma induzível por vários estímulos, como inflamação e estresse de cisalhamento (95-98).

Prostanoides derivados do ácido araquidônico assumem um papel crucial na regulação local do tônus vascular, tanto em situações fisiológicas quanto em estados patológicos, e evidências indicam que a prostaciclina participa tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da disfunção endotelial em animais SHR. Em aortas de SHR, o relaxamento dependente do endotélio reduzido está associado à produção de fatores contráteis derivados do endotélio, também observado por nós no presente estudo, e reduzido em animais hipertensos tratados com sildenafil. A liberação de prostanoides contráteis derivados da ciclooxigenase é responsável por essas contrações dependentes do endotélio. Os mecanismos subjacentes às contrações dependentes do endotélio na aorta de SHR envolvem a ativação da ciclooxigenase-1 endotelial, a difusão do EDCF e a subsequente estimulação dos receptores TP no músculo liso vascular. Foi observado por nós e por outros autores, que os inibidores da tromboxano sintase não afetam a contração dependente do endotélio à acetilcolina, indicando que o tromboxano A2 não é o fator de contração mais importante liberado após a ativação do receptor muscarínico. No entanto, a liberação maciça de prostaciclina, que na aorta de SHR paradoxalmente não é vasodilatadora, mas possui efeito vasoconstrictor (PG), e também a do endoperóxido PGH₂, explica a atividade biológica contrátil dos EDCF. De fato, a prostaciclina evoca nenhum ou pouco relaxamento na aorta de SHR e WKY, mais provável porque a expressão do gene do receptor PGI₂ (receptor IP) diminui com a idade e é sistemicamente menos expressa no SHR do que nos WKY em qualquer idade (99-103). No entanto, em resposta a outros estímulos, como a endotelina, a produção de tromboxano A2 também pode contribuir para as respostas de contração mediadas pelo EDCF. Em nosso estudo, analisamos as concentrações urinárias dos principais metabólitos de prostanóides vasoativos, prostaciclina e tromboxano A2. Nosso achado foi que os níveis urinários do metabólito de prostaciclina se encontra elevado em relação ao metabólito de tromboxano A2, o que nos faz sugerir que a prostaciclina está por trás da disfunção vascular contrátil encontrada em nosso estudo, e o tratamento com sildenafil reestabelece o equilíbrio entre PGI₂ e TXA₂ em animais hipertensos.

Além disso, as pesquisas demonstram que as ERO's podem estimular a cox-1, favorecendo à síntese de prostanoídes que, por sua vez, ativam receptores de tromboxano, além de diminuir a disponibilidade do NO, modulando de maneira indireta o tônus vascular. Para confirmar esta hipótese em nosso modelo experimental, realizamos o bloqueio da cox-1, com SC-560, em anéis de aorta e observamos, de fato, que nos animais hipertensos temos uma maior influência dos prostanoídes derivados da cox-1 na hipercontratibilidade vascular. Posteriormente, afim de verificar se os prostanoídes derivados da cox-1 estariam atuando através de receptores de TXA₂, promovendo aumento da resposta contrátil em aortas, utilizamos o SQ29458, um antagonista do receptor de tromboxano A₂, e verificamos que o antagonismo do receptor de tromboxano A₂ reverteu o aumento da contração vascular apresentada pelos animais SHR. Entretanto, em animais hipertensos tratados com sildenafil, não observamos diferença na resposta contrátil dos vasos quando realizamos o bloqueio com SC-560 e com o antagonista do receptor TXA₂ (receptor TP). Além do mais, estudos demonstram que os prostanoídes vasoconstritores podem promover um *Upregulation* da NADPH oxidase por meio da ativação de receptores TP, diminuindo consequentemente a biodisponibilidade de NO e a vasodilatação, e promovendo aumento da vasoconstricção (104-107). Contudo, observamos que o tratamento com sildenafil foi capaz de promover melhora da função endotelial e, por aumento na sinalização da via do NO no relaxamento vascular, e redução da participação dos prostanoídes na contração vascular, sendo esse um importante mecanismo para redução da hiper-reatividade aos agonistas adrenérgicos. Portanto, em síntese, demonstramos que o tratamento com sildenafil foi capaz de corrigir o distúrbio contrátil mediado pela via cox-1/prostaciclina/receptor TP, sugerida por nós. No entanto, não se pode descartar a participação de outros agentes vasocontráteis derivados do endotélio.

Alterações estruturais induzidas pela HA, em resposta a estímulos mecânicos, são bem descritas na literatura. Essas alterações, conhecidas como "remodelamento", são consideradas um processo complexo que pode envolver aumento (hipertrofia), diminuição (hipotrofia) ou reorganização (eutrofia) dos componentes da parede do vaso. É importante considerar o trabalho pioneiro de Folkow, no modelo SHR, que demonstrou que a alteração morfológica do vaso antecede a resposta vascular alterada, bem como o aumento sustentado da PA. Em

nosso estudo, observamos que os animais SHR apresentaram aumento na área seccão transversa como se pode observar na figura 19. Esses achados corroboram com pesquisas que demonstraram que a hipertensão crônica favorece as alterações vasculares, sendo que a disfunção endotelial e vias dos prostanóides está associada ao processo de remodelamento e tem sido diretamente correlacionada com eventos cardiovasculares adversos em pacientes com hipertensão. Sendo assim, estudos que investigam mecanismos moleculares e tratamento para essas condições têm grande relevância clínica (108-111).

Sabe-se que a hipertensão também está associada a alterações nos níveis circulantes, expressão de genes e tempo de vida celular das células progenitoras endoteliais (CPEs). Na literatura, os dados acerca disso ainda são conflitantes. Por exemplo, embora o número de CEPs de pacientes hipertensos tenha diminuído em muitos estudos, alguns até encontraram aumento nos níveis de CPE circulantes em pacientes hipertensos com rigidez arterial aumentada, por exemplo, (112-116). Em nosso estudo, descobrimos que os níveis de CPEs estavam aumentados em animais hipertensos em comparação com animais controle, e o tratamento com sildenafil por três semanas normalizou os níveis circulantes dessas células. A melhora nos parâmetros funcionais vasculares vistos anteriormente pode explicar a normalização dos níveis de CPE nesses animais, uma vez que a correlação positiva observada entre dano vascular e CPE, sugere que células progenitoras endoteliais poderiam ser mobilizadas em resposta a dano vascular, a fim de manter a integridade endotelial.

Também examinamos a camada superficial endotelial usando microscopia eletrônica de varredura. Como esperado, em conjunto com nossos dados funcionais, observamos em ratos SHR tratados com sildenafil uma significativa reendotelização. Essas observações são consistentes com os resultados obtidos no presente estudo em relação à reatividade vascular, sugerindo que o sildenafil apresentou notável ação de reendotelização.

Em conclusão, nosso trabalho demonstra que o tratamento com sildenafil em SHR por três semanas melhora a função vascular através da melhora na sinalização NO-GMPc-PKG e diminuição das ERO's, bem como redução da ativação do eixo Cox-1/PGI2/receptor TP. A melhora funcional estava acompanhada por redução da pressão arterial sistólica e diminuição da alteração morfológica vascular e dano à

camada superficial endotelial. Portanto, nossos dados fornecem uma demonstração clara de que o mecanismo central para o efeito benéfico do sildenafil envolve reparo na morfologia vascular, arquitetura endotelial, redução do estresse oxidativo, melhora no balanço entre prostanóides vasoconstrictores e vasodilatadores, aumento da biodisponibilidade de NO e melhoria da sinalização de GMPc e proteína kinase G.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram efeitos benéficos do tratamento crônico com sildenafil em animais SHR. Usando a técnica de reatividade vascular em anéis aórticos, observamos uma resposta de relaxamento deficiente à Ach (hiporresponsividade) e aumento da resposta à fenilefrina (hiperresponsividade) no grupo SHR, que foi causada principalmente devido a um desbalanço nas vias NO-GMPc-PKG/ERO's, aumento na ativação do eixo Cox-1/PGI2/receptor TP, e acompanhada por alteração morfológica vascular e dano à camada superficial endotelial. O presente estudo também mostra que a administração do sildenafil causou diminuição da PAS, melhora significativa da função vasodilatadora dependente do endotélio demonstrada por aumento no relaxamento induzido por acetilcolina, e diminuição da hipercontratilidade à fenilefrina em ratos espontaneamente hipertensos. Portanto, nossos dados fornecem uma demonstração clara de que o mecanismo central para o efeito benéfico do sildenafil envolve reparo na morfologia vascular, arquitetura endotelial, redução do estresse oxidativo, melhora no balanço entre prostanóides vasoconstrictores e vasodilatadores, aumento da biodisponibilidade de NO e melhoria da sinalização de GMPc e proteína kinase G.

REFERÊNCIAS

8. Referências

1. Abegunde D. O.; Mathers C. D.; Adam T.; Ortegon M.; Strong K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet*, **2007**, 370 (9603), 1929-38.
2. Angeli, F., Reboldi, G., Trapasso, M., Gentile, G., Pinzagli, M. G., Aita, A., & Verdecchia, P. (2019). European and US guidelines for arterial hypertension: similarities and differences. *European Journal of Internal Medicine*, in press. DOI: 10.1016/j.ejim.2019.01.01
3. Gopal, D.M., Kalogeropoulos, A.P., Georgiopoulou, V.V., Smith, A.L., Bauer, D.C., Newman, A.B., ... Butler, J. (2012). Cigarette smoking exposure and heart failure risk in older adults: the health, aging, and body composition study. *American heart journal*. *164*(2), 236–242. DOI: 10.1016/j.ahj.2012.05.013
4. DeMarco, V.G.; Aroor, A.R.; Sowers, J.R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **2014**,10(6):364-76.
5. Borges HP, et al. Associação entre hipertensão arterial e excesso de peso em adultos, Belém, Pará, 2005. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 2008; v.91, n.2, p.110- 18.
6. Nobre F. et. al. Hipertensão arterial sistêmica primária. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP*. 2013; 46(3):256-72.
7. VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, vol. 107, n. 3, supl 3. São Paulo, 2016.
8. Droyvold, W.B.; Midthjell, K.; Nilsen, T.I.; Holmen, J. Change in body mass index and its impact on blood pressure: a prospective population study. *Int. J. Obes. (Lond)*., **2005**, 29:650–655.
9. Forouzanfar, M. H.; Liu, P.; Roth, G. A.; Ng, M.; Biryukov, S.; Marczak, L.; Murray, C. J. L. Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015. *JAMA - J. of the Amer. Med. Assoc.*, **2017**, 317(2), 165–182.
10. Havas S, Dickinson BD, Wilson M., The urgent need to reduce sodium consumption. *JAMA*. 2007 Sep 26;298(12):1439-41.
11. Rapsomaniki, E.; Timmis, A.; George, J.; Pujades-Rodriguez, M.; Shah, A. D.; Denaxas, S.; Hemingway, H. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: Lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *The Lancet*, **2014**, 383(9932), 1899–1911.
12. Lewington, S.; Clarke, R.; Qizilbash, N.; Peto, R.; Collins, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-

- analysis of individual. *Lancet*, **2002**, 360(9349), 1903–13.
13. Leckie, B. J. Targeting the renin-angiotensin system: what's new? *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.*, **2005**, 3(1), 23-32
 14. Lezama-Martínez D, Valencia-Hernández I, Flores-Monroy J, Martínez-Aguilar L. Combination of β Adrenergic Receptor Block and Renin-Angiotensin System Inhibition Diminished the Angiotensin II-Induced Vasoconstriction and Increased Bradykinin-Induced Vasodilation in Hypertension. *Dose Response*. **2017**, 12;15(4):1559325817737932.
 15. Campos, R. R., Bergamaschi, C. T. Comments on Point:Counterpoint: The dominant contributor to systemic hypertension: Chronic activation of the sympathetic nervous system vs. Activation of the intrarenal renin-angiotensin
 16. system. Sympathetic activation: cause or consequence of hypertension? *J. Appl. Physiol.* (1985), **2010**, 109(6), 2013-4.
 17. Crowley, S. D. The Cooperative Roles of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 20(1), 102–120.
 18. Landmesser, U.; Drexler, H. Endothelial function and hypertension. *Curr. Opin. Cardiol.*, 2007, 22(4), 316-20.
 19. Vanhoutte PM,. Nitric Oxide: From Good to Bad. *Ann Vasc Dis*. 2018 Mar 25;11(1):41-51.
 20. Zhao Y1, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*. 2015 Oct;129(2):83-94.
 21. McCarron JG, Wilson C, Heathcote HR, Zhang X, Buckley C, Lee MD. Heterogeneity and emergent behaviour in the vascular endothelium. *Curr Opin Pharmacol*. 2019 Apr 18;45:23-32.
 22. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH,. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017 Jan;219(1):22-96.
 23. Vanhoutte PM,. Endothelial Lessons. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14(2):175-80.
 24. Félétou M, Köhler R, Vanhoutte PM,. Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses.*Ann Med*. 2012 Nov;44(7):694-716
 25. Vanhoutte PM, Mombouli JV., Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996 Nov-Dec;39(3):229-38.

26. Meyrelles SS, Peotta VA, Pereira TM, Vasquez EC,. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging.
27. Vasquez EC, Gava AL, Graceli JB, Balarini CM, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS. Novel Therapeutic Targets for Phosphodiesterase 5 Inhibitors: current state-of-the-art on systemic arterial hypertension and atherosclerosis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17(4):347-64.
28. Mónica FZ, Bian K, Murad,. The Endothelium-Dependent Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Adv Pharmacol.* 2016;77:1-27.
29. Ghiadoni L, Taddei S, Virdis A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2012; 10(1), 42-60.
30. Roca F, Bellien J, Iacob M, Joannides R,. Endothelium-dependent adaptation of arterial wall viscosity during blood flow increase is impaired in essential hypertension. *Atherosclerosis.* 2019 Jun;285:102-107.
31. Paravicini T. M.; Touyz, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, **2008**, 31 Suppl 2, S170-80.
32. Scicchitano P, Cortese F, Gesualdo M, De Palo M, Massari F, Giordano P, Ciccone MM,. The role of endothelial dysfunction and oxidative stress in cerebrovascular diseases. *Free Radic Res.* 2019 May 20:1-471.
33. Rubanyi, G.M.; Vanhoutte, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am. J. Physiol.*, **1986**, 250, H822–H827.
34. Sagar, S.; Kallo, I. J.; Kaul, N.; Ganguly, N. K.; Sharma, B. K. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* **1992**, 111(1-2), 103-8.
35. Pinheiro LC, Oliveira-Paula GH,. Sources and effects of oxidative stress in hypertension. *Curr Hypertens Rev.* 2019 May 30.
36. Yang X, Li Y, Li Y, Ren X, Zhang X, Hu D, Gao Y, Xing Y, Shang H,. Oxidative Stress Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front Physiol.* 2017 Aug 23;8:600.
37. Montezano AC, Touyz RM,. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Jan 1;20(1):164-82.
38. Sergio Di Meo, Tanea T. Reed, Paola Venditti, and Victor Manuel Victor,. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 1245049.

39. Guzik, T. J.; Touyz, R. M. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, **2017**, 70, 660–667.
40. Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G., & Chrissobolis, S. (2014). Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. DOI: 10.1155/2014/406960
41. Balarini, C. M.; Leal, M. A.; Gomes, I. B. S.; Pereira, T. M. C.; Gava, A. L.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *Journal of Translational Medicine*, **2013**, 11(1), 3.
42. Andreia G. F. Friques, et al., Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Transl Med*. 2015; 13: 390.
43. Yanes L, et al., Systemic arterial pressure response to two weeks of Tempol therapy in SHR: involvement of NO, the RAS, and oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Apr;288(4):R903-8.
44. Anna Konior, et al., NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jun 10; 20(17): 2794–2814.
45. Rajagoplan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B. A.; Griendling, K. K.; et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J. Clin. Invest.*, **1996**, 97, 1916–1923.
46. Nakazono K, et al., Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10045-8.
47. Taddei S, et al., Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998 Jun 9;97(22):2222-9.
48. Tang, E. H.; Vanhoutte, P. M. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol. Ther.*, **2009**, 122(2), 140-9.
49. Ellinsworth, D. C., Shukla, N., Fleming, I., & Jeremy, J. Y. (2014). Interactions between thromboxane A₂, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovascular Research*, 102(1), 9–16.
50. García-Redondo, A. B.; Briones, A. M.; Beltrán, A. E.; Alonso, M. J.; Simonsen, U.; Salaices, M. Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**, 328(1), 19-27.
51. S. Moncada, R. Gryglewski, S. Bunting & J. R. Vane. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* Vol. 263 October 21 1976

52. M. Suzuki, A. Yanagisawa, Ryori. Noyori., Prostaglandin synthesis. 16. The three-component coupling synthesis of prostaglandins. *J. Am. Chem. Soc.* 1988; 110(14): 4718-4726
53. Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res.* 2001; 89:650–660.
54. Michael Sze-Ka Wong and Paul Michel Vanhoutte., COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta Pharmacol Sin.* 2010 Sep; 31(9): 1095–1102.
55. Pascale Gluais, et al., Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br J Pharmacol.* 2005 Nov; 146(6): 834–845.
56. Xiao Yu Tian, et al., Oxidative Stress-Dependent Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin F_{2α} Impairs Endothelial Function in Renovascular Hypertensive Rats. *Antioxid Redox Signal.* 2012 Feb 15; 16(4): 363–373.
57. Michel Félétou, et al., Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011 Oct; 164(3): 894–912.
58. Paul M Vanhoutte and Eva H C Tang,. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J Physiol.* 2008 Nov 15; 586(Pt 22): 5295–5304.
59. Michel Félétou, Tony J Verbeuren, and Paul M Vanhoutte. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol.* 2009 Feb; 156(4): 563–574.
60. Emanuela Ricciotti, PhD and Garret A. FitzGerald., Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 May; 31(5): 986–1000.
61. Zhonghua Qi, et al., Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 2002 Jul 1; 110(1): 61–69.
62. Helene Francois and Thomas M. Coffman. Prostanoids and blood pressure: which way is up? *J Clin Invest.* 2004 Sep 15; 114(6): 757–759.
63. Takayuki Matsumoto, et al., Constrictor prostanoids and uridine adenosine tetraphosphate: vascular mediators and therapeutic targets in hypertension and diabetes. *Br J Pharmacol.* 2015 Aug; 172(16): 3980–4001.
64. Ananda T Dias, et al., Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *J Transl Med.* 2014; 12: 250.
65. Thais A. Jacinto, et al., Increased ROS production and DNA damage in monocytes are biomarkers of aging and atherosclerosis. *Biol Res.* 2018; 51: 33.

66. Bo Li, et al., Beneficial Effects of Paeoniflorin Enriched Extract on Blood Pressure Variability and Target Organ Damage in Spontaneously Hypertensive Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017; 2017: 5816960.
67. Sin Bond Leung, et al., Attenuation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats by acupuncture was associated with reduction oxidative stress and improvement from endothelial dysfunction. *Chin Med.* 2016; 11(1): 38.
68. Jinjuan Fu, et al., Irisin Lowers Blood Pressure by Improvement of Endothelial Dysfunction via AMPK-Akt-eNOS-NO Pathway in the Spontaneously Hypertensive Rat. *J Am Heart Assoc.* 2016 Nov; 5(11): e003433.
69. Mahdi Hamidi Shishavan, et al., Metformin Improves Endothelial Function and Reduces Blood Pressure in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats Independent from Glycemia Control: Comparison to Vildagliptin. *Sci Rep.* 2017; 7: 10975.
- 70.

