

Efeitos do tratamento com sildenafil sobre a função vasoconstritora na hipertensão experimental

Bernah Mathias Fahning

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Dezembro de 2014

Efeitos do tratamento com sildenafil sobre a função vasoconstritora na hipertensão experimental

Bernah Mathias Fahning

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Dezembro de 2014

Efeitos do tratamento com sildenafil sobre a função vasoconstritora na hipertensão experimental

Bernah Mathias Fahning

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em:

Por:

Thiago de Mello Costa Pereira
Professor titular da Universidade Vila Velha
Membro externo da Banca Examinadora

Silvana dos Santos Meyrelles
Professora Associada da Universidade Federal do Espírito Santo
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr Elisardo Corral Vasquez
Professor Emerito a Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dra. Ivanita Stefanon
Coordenadora PPGCF-UFES

Vitória, Dezembro de 2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Fahning, Bernah Mathias

Efeitos do tratamento com sildenafil sobre a função vasoconstritora na hipertensão experimental / Bernah Mathias Fahning. – Vitória, UFES / PPGCF, 2014.

104f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, dezembro de 2014.

Orientação: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez.

1. Hipertensão. 2. Disfunção Endotelial. 3. Angiotensina. 4. Pressão de perfusão. Fisiologia Cardiovascular - Dissertação. I. Vasquez, Elisardo Corral, Nome. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título

CDU: 612

Dedico as minhas avós Delourdes (*in memorian*) e Jozilda.

AGRADECIMENTOS

Neste momento especial da minha vida, não poderia deixar de agradecer aos que estiveram comigo, dando apoio, incentivo, ou simplesmente ao meu lado nesse momento importante.

Primeiramente agradeço à Deus, pois sem Ele nada somos. Tudo o que acontece em nossa vida tem uma razão e por mais que fiquemos contrariados, nEle encontramos o conforto de sabermos que Ele tem um propósito para toda dificuldade e objetivo alcançado.

Agradeço à minha mãe, que desde de criança nos mostra os caminhos da vida, as dificuldades e nos aconselha qual caminho seguir. Agradeço pelo 'investimento' e pelos dias e noites perdidas e reconheço que hoje, concluo mais esta etapa da minha vida graças à você. Te amo.

À minha irmã, comadre, colega de profissão, 'chefe' e amiga Bárbara pelo apoio e amizade compartilhada ao longo dessa vida. É um orgulho tê-la como irmã e colega de profissão. Obrigado pelo maior presente que uma irmã podia dar, uma sobrinha! Mesmo que ela não entenda muito o que eu faço, tento ser um exemplo para ela. Aproveito também para agradecer ao meu cunhado Diego, pelos incentivos e pelas horas de distração 'tomando uma gelada' e divagando sobre assuntos aleatórios.

Estendo este agradecimento à toda família Mathias Fahning, avós, meu pai, madrasta, tios, tias e primos pelo apoio e pelo reconhecimento que eu sinto vindo de vocês. A família é a base de tudo e tenho certeza que tenho uma base forte!

À Fernanda, que mesmo a mais de 1000km de distância foi uma das maiores, se não a maior, incentivadora que tive ao longo desses anos em que estamos juntos. Mesmo distante fisicamente, cada dia que passa sinto você mais próxima de mim. Amo você.

À turma farmaufes 2007/1, um agradecimento especial, pois não haveria melhor turma para eu ter feito parte. Todos os momentos de alegria e desavenças estão gravados em minha memória e certamente foram especiais para formamos essa amizade que perdura até hoje. Em especial a Laura e Kamilete, pela amizade compartilhada desde o primeiro dia de aula até hoje. Vocês são muito importantes para mim.

Claro que não podia deixar de agradecer aos meus *Brothers* Olavo, Marito e Gustavo, que considero mais que amigos, são os irmãos que a UFES me deu. Agradeço pelo incentivo, pelos momentos de distrações, pelos desentendimentos que fazem a gente ter essa amizade sincera e verdadeira que temos.

Não por menos, outros amigos que tiveram participação importantíssima nessa caminhada, que muitas vezes entenderam as ausências, ainda que raras, mas necessárias para conclusão desta etapa. Vítinho, André Gabeh, Aleister e turma do cefetes. Muito obrigado.

À Leandro 'Pomerano', antes somente veterano e agora amigo, muito obrigado por você ter sido o melhor veterano que eu podia ter. Desde às calouradas, ao material emprestado, indicação para vaga na iniciação científica, estágio e conselhos (que alguns eu não ouvi, infelizmente).

À Camille, que desde a minha entrada no laboratório sempre admirei sua dedicação e inteligência. Obrigado por ter acreditado no meu potencial e pelos conselhos e exemplos que você me deu e que neste momento fazem muito sentido para mim.

Gostaria de agradecer ao Professor Vasquez, por ter aceitado ser meu orientador e professor. Agradeço pela sua paciência, educação e dedicação e tenho muito orgulho em dizer que sou seu aluno.

À professora Silvana, por ter me aceitado no LTCC como candidato à IC e por todo aprendizado ao longo desses anos no laboratório, muito obrigado.

À professora Àgata, que foi minha professora na graduação e despertou meu interesse em fisiologia, muito obrigado pelos ensinamentos e disponibilidade para atender os alunos. Certamente você é um exemplo a ser seguido.

À todos os professores do LTCC bem como todos os colegas que passaram e ainda estão no laboratório, obrigado pelo tempo em que passamos juntos, no desespero dos experimentos que insistiam em dar errados, pelos momentos de descontração e happy hour!

Agradeço ao apoio técnico dos funcionários do PPGCF, aos professores e alunos pela disponibilidade e ensinamentos compartilhados.

Muito Obrigado!

“...Eu bato o portão sem fazer alarde
Eu levo a carteira de identidade
Uma saideira, muita saudade
E a leve impressão de que já vou tarde.”

(Chico Buarque)

RESUMO

As doenças cardiovasculares representam a maior parte das mortes pré-maturas em homens e mulheres. A hipertensão arterial sistêmica é uma doença e um fator de risco para as DCV, sendo considerada um dos maiores desafios em saúde pública. A HAS é uma condição multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, associada frequentemente às alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos alvos. A hipertensão renovascular é definida como a HAS decorrente de uma isquemia renal, geralmente causada por uma lesão obstrutiva parcial ou completa de uma ou ambas artérias renais. Os primeiros estudos experimentais datam de 1934 por Goldblatt e colaboradores. O modelo inicialmente utilizou-se cães em que era obstruída parcialmente uma das artérias renais à fim de estudar seus efeitos. Posteriormente, foi adaptada à ratos e camundongos e tal modelo usado mundialmente ficou conhecido por 2R1C. O mecanismo envolvido no desenvolvimento e manutenção da hipertensão 2R1C está na ativação contínua do Sistema-Renina-Angiotensina. Estudos anteriores já demonstram que este modelo desenvolve disfunção endotelial e aumento do estresse oxidativo, o que prejudica sua função vascular. Dentro deste contexto, o sildenafil aparece como uma alternativa de tratamento, devido ao fato de ser um inibidor da enzima PDE5, aumentando a oferta do GMPc e por consequência o NO. Além disso, outros estudos vêm demonstrando que o sildenafil diminui a atividade da NADPH oxidase, principal enzima produtora das EROs. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do sildenafil sobre a função contrátil, o estresse oxidativo e produção das frações de angiotensina. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6, com aproximadamente 23 gramas. Os animais foram divididos em três grupos: Sham, 2R1C e 2R1C tratado com sildenafil (40mg/kg/dia). O tratamento iniciou 14 dias após a indução da hipertensão. 28 dias após a implantação do clipe ou cirurgia fictícia alguns animais foram canulados para aferição da pressão arterial e frequência cardíaca, outros animais foram anestesiados, o LVM foi canulado e isolado para avaliação da função contrátil por meio da construção de curvas dose-resposta à Norepinefrina (NOR). Os rins foram retirados e alguns foram armazenados em nitrogênio líquido para dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) o que reflete a peroxidação lipídica consequência do estresse oxidativo presente neste modelo de hipertensão. O plasma foi armazenado para verificar os níveis das frações de angiotensina. A resposta

máxima ($R_{\text{máx}}$) e o logaritmo negativo da concentração de droga que provocou metade da resposta máxima (pEC_{50}) foram calculados. Resultados de manobras farmacológicas foram expressas como a diferença na área abaixo da curva (ΔAUC). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As comparações estatísticas das curvas dose-resposta foram feitas por ANOVA de 2 vias, seguida de *post hoc* de tukey. As comparações de $R_{\text{máx}}$ e pEC_{50} , parâmetros biológicos, medidas hemodinâmicas, dosagem de angiotensinas e TBARS foram feitas por ANOVA de 1 via seguido de *post hoc* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ e $p < 0,01$ foram considerados como estatisticamente significantes. Os animais 2R1C apresentaram aumento na pressão arterial média e frequência cardíaca (127 ± 48 e 514 ± 7 respectivamente) quando comparados ao grupo sham (105 ± 2 e 441 ± 9) e o tratamento com sildenafil diminuiu a PAM e FC (114 ± 2 e 471 ± 12) quando comparados aos animais 2R1C. As frações de Angiotensina I e II plasmáticas não sofreram alterações significantes entre os grupos e a fração de Angiotensina-(1-7) se mostrou elevada nos animais tratados com sildenafil quando comparados aos grupos 2R1C e sham (146 ± 13 vs 102 ± 10 e 100 , respectivamente). De mesmo modo as TBARS dos animais 2R1C se mostram aumentadas quando comparadas ao grupo sham sendo restaurada após o tratamento com sildenafil (101 ± 9 vs 63 ± 7 vs 64 ± 12 , respectivamente). Os animais 2R1C apresentaram acentuada hiper-reatividade à NOR quando comparados ao sham ($R_{\text{máx}} 162 \pm 14$ vs 118 ± 12 , respectivamente) sendo que o tratamento com sildenafil foi capaz de reverter a hiper-reatividade apresentada (116 ± 9). A ΔAUC após a remoção do endotélio demonstra que a função endotelial dos animais 2R1C está prejudicada em relação ao Sham (86 ± 7 vs 201 ± 27 , respectivamente) enquanto que o tratamento com sildenafil proporciona uma melhora nesta função (134 ± 13). O ΔAUC antes e após a adição de apocinina (bloqueador da NADPH oxidase) demonstra que nos animais 2R1C a contratilidade aumentada está relacionada ao aumento do estresse oxidativo quando comparados ao Sham (101 ± 16 vs 15 ± 6 , respectivamente) e o sildenafil elimina este aumento da atividade da NADPH oxidase (4 ± 2). Desta maneira é possível concluir que o tratamento com sildenafil melhora a função vascular na hipertensão experimental. Os mecanismos envolvidos envolvem o aumento dos níveis de Ang-(1-7), diminuição do estresse oxidativo e melhora da função endotelial, refletindo também na melhora da PAM e FC.

Palavras-Chave: Hipertensão, 2R1C, hiper-reatividade, estresse oxidativo, sildenafil

ABSTRACT

Cardiovascular diseases account for the majority of pre-mature deaths in the world. Hypertension is a disease and a risk factor for CVD, and is considered one of the major challenges in public health. Hypertension is a multifactorial condition characterized by high and sustained levels of blood pressure often associated with functional and/or structural changes in target organs.

The renovascular hypertension is defined as hypertension due to renal ischemia, usually caused by a partial or complete obstructive lesion of one or both renal arteries. The first experimental studies dating back to 1934 by Goldblatt and colleagues. The model was initially used in dogs which was partially blocked one of the renal arteries in order to study their effects. It was later adapted to rats and mice and such a model used worldwide was known for 2K1C.

The mechanism involved in the development and maintenance of 2K1C hypertension is the continuous activation of the renin-angiotensin-system. Previous studies have shown that this model develops endothelial dysfunction and increased oxidative stress, which damages your vascular function.

Within this context, sildenafil appears as an alternative treatment, due to the fact that an inhibitor of PDE5 enzyme, increasing the supply of cGMP and therefore the NO. In addition, other studies have shown that sildenafil decreases the activity of NADPH oxidase is a key enzyme production of ROS. The objective of this study was to evaluate the effects of sildenafil on the contractile function, oxidative stress and production of angiotensin fractions. Male mice were C57BL/6 mice with approximately 23 grams. The animals were divided into three groups: Sham, 2K1C 2K1C and treated with sildenafil (40 mg/kg/day). Treatment started 14 days after the induction of hypertension. 28 days after implantation of the dummy clip or surgery some animals were cannulated for blood pressure measurement and cardiac frequency, other animals were anesthetized, LVM was cannulated and isolated for evaluation of contractile function through the construction of dose-response curves to norepinephrine (NOR). The kidneys were removed and some were stored in liquid nitrogen for determination of thiobarbituric acid (TBARS) which reflects lipid peroxidation consequence of oxidative stress present in this model of hypertension. The plasma was stored for checking the levels of angiotensin fractions. The maximal

response (R_{max}) and the negative logarithm of drug concentration which caused half-maximal response (pEC_{50}) was calculated. Results of pharmacological maneuvers were expressed as the difference in area under the curve (ΔAUC). Results were expressed as mean \pm SEM. Statistical comparisons of dose-response curves were made by 2-way ANOVA followed by post hoc Tukey test. Comparisons of R_{max} and pEC_{50} , biological parameters, hemodynamic measurements, angiotensin dosage and TBARS were made by ANOVA 1 way followed by post hoc Bonferroni. A value of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered statistically significant. The 2K1C animals showed an increase in mean arterial pressure and heart rate (127.9 ± 3.8 and 514.2 ± 7.4 , respectively) when compared to the sham group (105.2 ± 2.4 and 441 ± 9.7) and treatment with sildenafil decreased MAP and HR (114.7 ± 2.4 and 471.4 ± 12) compared to 2K1C animals. The fractions of plasma angiotensin I and II did not show significant changes between the groups and the fraction of angiotensin-(1-7) proved to be higher in animals treated with sildenafil compared to 2K1C and sham groups (146 ± 13.3 vs. 102 ± 10.4 and 100 , respectively). Likewise the TBARS 2K1C animals show increased if compared to the sham group being restored after treatment with sildenafil (101.5 ± 9.1 vs 63.7 ± 7.0 vs. 64.4 ± 12.5 , respectively). The 2K1C animals showed marked hyperresponsiveness when compared to the sham NOR (R_{max} 162 ± 14 vs. 118 ± 12 , respectively) and the treatment with sildenafil was able to revert the displayed hyperreactivity (116 ± 9). The ΔAUC after removal of endothelium demonstrates that the endothelial function is impaired in 2K1C animals compared to sham (86 ± 7 vs 201 ± 27 , respectively), while treatment with sildenafil provides an improvement in this function (134 ± 13). The ΔAUC before and after the addition of apocynin (blocker of NADPH oxidase) shows that the increased contractility 2K1C animals is associated with increased oxidative stress when compared to Sham (101 ± 16 vs 15 ± 6 , respectively) and sildenafil deletes this increase in NADPH oxidase atividade (4 ± 2). Thus it can be concluded that the treatment with sildenafil improves vascular function in experimental hypertension. The mechanisms involved involve increased levels of Ang-(1-7), decreased oxidative stress and improved endothelial function, reflecting also on the improvement of MAP and HR.

Keywords: Hypertension, 2K1C, hyperreactivity, oxidative stress, sildenafil

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Taxa de mortalidade por DCV e suas diferenças causas no Brasil	21
Figura 2: Esquema representativo dos efeitos hemodinâmicos da angiotensina II.....	26
Figura 3: Efeito da estenose arterial no modelo 2R1C.....	27
Figura 4: Efeitos não-hemodinâmicos da Angiotensina II.....	28
Figura 5: Esquema representativo das reações que ocorrem nas células endoteliais.....	31
Figura 6: Esquema representativo do protocolo experimental.....	39
Figura 7: Demonstração da implantação do clipe na artéria renal do rim esquerdo.	40
Figura 8: Representação esquemática do protocolo de tratamento utilizado	41
Figura 9: Representação esquemática dos banhos orgânicos utilizados para o estudo da reatividade vascular	43
Figura 10: representação esquemática da avaliação da viabilidade dos anéis	44
Figura 11: Representação esquemática da avaliação da integridade do endotélio	44
Figura 12: Esquema representativo do sistema utilizado para realização do estudo da reatividade	46
Figura 13: Representação típica de uma curva dose-resposta à noradrenalina	47
Figura 14: Efeito do sildenafil nos valores de repouso das médias de pressão arterial e frequência cardíaca no modelo de hipertensão renovascular 2R1C comparados com camundongos 2R1C não tratados e Sham.	52
Figura 15: Efeitos do sildenafil na vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico e por Phe em anéis de aorta no modelo de hipertensão renovascular 2R1C comparados com camundongos 2R1C não tratados e Sham.	54
Figura 16: Representação típica de registros de Curvas dose-respostas no LVM nos diferentes grupos experimentais.....	55
Figura 17: Efeito do sildenafil na vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico em camundongos hipertensos 2R1C comparados com camundongos 2R1C não tratados e Sham sob condição normal (E+) e após remoção do endotélio (E-).....	56
Figura 18: Figura 19: Efeitos do sildenafil na vasoconstrição induzida por NOR no LVM em animais com hipertensão 2R1C comparados aos camundongos 2R1C não tratados e Sham sob condição normal (controle) e após o bloqueio da NADPH oxidase com apocinina.	58
Figura 19: Efeito do sildenafil na angiotensina I, II e 1-7 plasmática no modelo animal de hipertensão renovascular 2R1C comparado com camundongos 2R1C não tratados e Sham	59
Figura 20: Efeito do sildenafil no estresse oxidativo arteriolar.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal e dos órgãos do modelo experimental.	53
Tabela 2: Efeitos do sildenafil sobre os parâmetros da curva dose-resposta à NOR.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

2R1C: 2-Rins-1-Clipe

ACh: Acetilcolina

Ang-(1-7): Angiotensina-(1-7)

AngI: Angiotensina I

AngII: Angiotensina II

ANOVA: Análise de Variância

AT1: Receptor de Angiotensina II do tipo 1

AT2: Receptor de Angiotensina II do tipo 2

BH4: Tetrahidrobiopterina

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

COX: Cicloxigenase

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

CYP: Cytochrome P₄₅₀

DCV: Doenças Cardiovasculares

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2: Enzima Conversora de Angiotensina induzível

EDCF: Fatores constrictores derivados do endotélio

EDHF: Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF: Fator de relaxamento derivado do endotélio

EETs: Ácidos epoxieicosatrienóicos

EMESCAM: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia

eNOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial

EPM: Erro Padrão da Média

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

ET-1: Endotelina-1

FC: Frequência Cardíaca

GMPc: Guanosina Monofosfato cíclico

GTP: Guanosina Trifosfato

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HAS: Hipertensão Arterial

HPLC: High-Pressure Liquid Chromatography

LVM: Leito Vascular Mesentérico

MDA: Malondialdeído

NADPH oxidase: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase

NEP: Neutral endopeptidase

NIH: National Institute of Health

NO: Óxido Nítrico

NOR: Norepinefrina

O₂⁻: Anion Superoxido

O₂: Oxigenio molecular

OH: Radical Hidroxil

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻: Peroxinitrito

PA: Pressão Arterial

PAM: Pressão arterial média

PAP: Pressão Arterial Pulsátil

PCP: Prolylcarboxypeptidase

PDEs: Fosfodiesterases

PDE5: Fosfodiesterase 5

pEC₅₀: - log EC₅₀

PEP: Prolylendopeptidase;

PGI₂: Prostaciclina

PGX: Prostaglandina X

Phe: Fenilefrina

Rmax: Resposta Máxima

RNA mensageiro:

SHAM: Sham operated. Cirurgia Fictícia

SRA: Sistema-Renina-Angiotensina

SUS: Sistema Único de Saúde

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

VIGITEL: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VSCM: Vascular Smooth Muscle cell

ΔAuc: Diferença da Área Abaixo da Curva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Epidemiologia.....	21
1.2 Hipertensão Renovascular.....	23
1.2.1 Sistema Renina Angiotensina.....	24
1.2.2 Angiotensina-(1-7)	28
1.2.3 Hipertensão e Estresse Oxidativo.....	29
1.3 Inibidores da Fosfodiesterase (Sildenafil)	32
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivos Gerais.....	36
2.2 Objetivos Específicos.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Animais Experimentais.....	38
3.2 Grupos Experimentais.....	38
3.3 Obtenção da Hipertensão Renovascular Experimental 2 Rins 1 Clipe	39
3.4 Tratamento dos animais.....	41
3.5 Medidas hemodinâmicas	41
3.6 Parâmetros biológicos	42
3.7 Estudos de função vascular.....	42
3.7.1 Reatividade do leito aórtico	42
3.7.1.1 Avaliação da Viabilidade dos Anéis e Teste do Endotélio.....	43
3.7.1.2 Protocolos de Reatividade Vascular.....	44
3.8 Reatividade do Leito Vascular Mesentérico.....	45
3.8.1 Reatividade do LVM ao vasoconstrictor NOR.....	46
3.8.2 Avaliação da participação dos derivados do endotélio na contração do LVM.....	47
3.8.3 Avaliação da participação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na contração do LVM.....	47
3.9 Dosagem de angiotensina plasmática.....	48
3.10 Avaliação da peroxidação lipídica.....	49
3.11 Análise estatística	49
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Medidas Hemodinâmicas	51

4.2 Parâmetros biológicos	53
4.3 Estudos da função vascular.....	53
4.3.1 Reatividade vascular.....	53
4.3.2 Participação do endotélio na reatividade do LVM.....	55
4.3.3 Participação das EROs na reatividade do LVM.....	57
4.4 Dosagem das angiotensinas plasmáticas	58
4.5 Avaliação da peroxidação lipídica.....	59
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO	71
7. REFERÊNCIAS	73
8. Cópia do manuscrito submetido.....	80

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCV) representam cerca de um terço das mortes pré-maturas em homens e um quarto em mulheres. Sendo ao mesmo tempo uma doença e um fator de risco para outras DCV, como acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e doença renal crônica, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um dos maiores desafios em saúde pública. A elevação da pressão arterial (PA) aumenta progressivamente a mortalidade por DCV. Em 2007 foram registradas 1.157.509 internações por DCV no sistema único de saúde (SUS) e 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório. Em relação aos custos, em novembro de 2009, houve 91.970 internações, resultando em um custo de R\$165.461.644,33 para a saúde pública (DATASUS, 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mundialmente, a HAS seja causa de 9,4 milhões de mortes, representando 45% do total de mortes por doenças do coração e 51% do total de mortes por acidente vascular cerebral anuais. No Brasil, 29,4% das mortes registradas em 2007 foram devidas às DCV, sendo que 12,8% foram causadas por HAS (figura 1). Estima-se que 30% da população mundial adulta pode ter a pressão arterial elevada. (SBC, 2010; WHO, 2013; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; BERNATOVA, 2014)

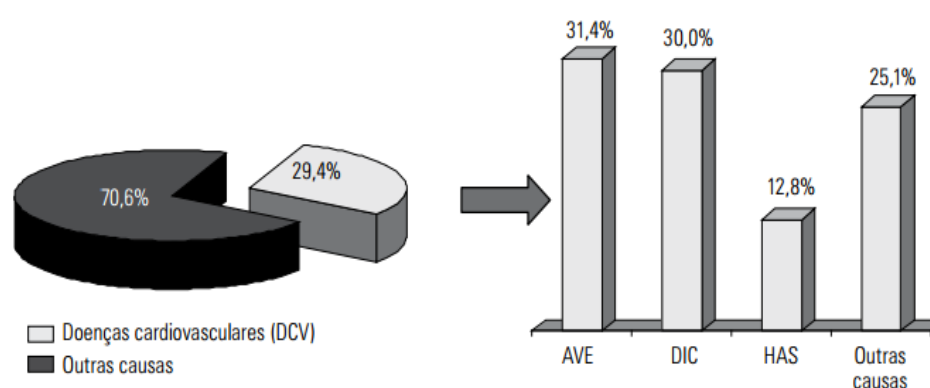


Figura 1: Taxa de mortalidade por DCV e suas diferenças causas no Brasil, em 2007 (AVE = Acidente vascular encefálico; DIC: doença isquêmica do coração; HAS: Hipertensão arterial sistêmica. Fonte: BRANDÃO *et al.*, 2010)

A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (Pressão Sistólica \geq 140 mmHg; Pressão Diastólica \geq 90mmHg). É associada frequentemente às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e alterações metabólicas,

com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (SBC, 2010; KUPPASANI & REDDI, 2010; OWENS, 2011; POLLY et al., 2011).

Segundo dados da OMS, a maior prevalência da HAS para adultos maiores de 25 anos é encontrada no continente africano enquanto a menor é encontrada nas Américas (46% e 35%, respectivamente). Devido às fracas condições do sistema de saúde dessas regiões, o número de pessoas com hipertensão que não são diagnosticadas, não são tratadas e não tem a pressão arterial controlada são maiores que as regiões de alta renda (WHO, 2013).

O sistema Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico) publicou um estudo demonstrando que a frequência de diagnóstico médico de hipertensão arterial alcançou 22,7% no conjunto da população adulta (maior de 18 anos), sendo maior em mulheres (25,4%) do que em homens (19,5%). Essa frequência de diagnóstico de hipertensão arterial se tornou mais comum com o avanço da idade, para ambos os sexos.

Ainda acerca deste estudo, a cidade de Vitória, foi classificada como a quarta cidade com maior percentual de adultos com diagnósticos prévios de HAS (25%) dentre as capitais do país e o distrito federal, tendo a cidade do Rio de Janeiro o maior índice (29,8%) (VIGITEL, 2012).

A HAS raramente causa sintomas nas fases iniciais da doença e muitas pessoas não são diagnosticadas mesmo já apresentando a pressão arterial elevada e sustentada. Além disso, em muitos casos, mesmo aqueles que são diagnosticados não podem ter acesso ao tratamento e não conseguem controlar com êxito a doença em longo prazo. Apesar do conhecimento atual e extensas pesquisas experimentais e clínicas, a causa da hipertensão é desconhecida em até 95% dos casos (BERTANOVA, 2014).

A HAS pode ser classificada como primária (essencial) ou secundária. A forma primária tem por causa diversos fatores em que se incluem fatores ambientais e genéticos associados ou não e a secundária é vinculada a um processo previamente definido, como por exemplo, a estenose da artéria renal denominada de hipertensão renovascular. A hipertensão renovascular ocorre entre 2 a 5% de todos os casos de hipertensão da população geral podendo ser de até 40% em casos de hipertensão secundária (LEWANDOWSKI, 2003; OZSARLAK O, *et al*, 2004).

1.2 Hipertensão Renovascular

De acordo com a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010), a hipertensão renovascular é definida como a HAS decorrente de uma isquemia renal, geralmente causada por uma lesão obstrutiva parcial ou completa de uma ou ambas as artérias renais. É, portanto, uma condição secundária gerada pela estenose da artéria renal associada ou não às doenças ateroscleróticas. Sua prevalência atinge 5% dos pacientes com HAS (KHANGURA *et al.*, 2013).

Em 1934, Goldblatt e colaboradores foram pioneiros no estudo da hipertensão renovascular ao desenvolverem um modelo experimental, em cães, que consistia em obstruir de maneira regulável a artéria renal e estudar os seus efeitos. Este modelo ficou conhecido por 2-Rins-1-Clipe (2R1C) e foi aperfeiçoado ao longo do tempo em outros modelos, principalmente em ratos e camundongos. Em estudos subsequentes foi demonstrado que uma lesão obstrutiva não deve ser tão severa ao ponto de causar isquemia renal, mas deve causar redução na perfusão renal a níveis de 75-80% na medida do fluxo arterial através da lesão para produzir significativas mudanças hemodinâmicas. (MAY *et al.*, 1963; KOBORI *et al.*, 2007; DORNAS *et al.*, 2011). Em nosso laboratório, vários estudos já foram realizados tendo o modelo 2R1C como modelo experimental em camundongos (ARRUDA *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2012; CAMPAGNARO *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2014).

O mecanismo envolvido no desenvolvimento e manutenção da hipertensão 2R1C depende principalmente da ativação contínua do Sistema-Renina-Angiotensina (SRA). Sabe-se que o tempo de manutenção da pressão elevada e os níveis pressóricos atingidos no modelo 2R1C dependem da espécie e do grau de estenose da artéria renal. Em 1997, Wiesel e colaboradores demonstraram que, para o modelo murino, quatro semanas já são suficientes para induzir a hipertensão renovascular e que a abertura do clipe implantado no animal (0,12mm) e tempo de vida do animal quando é realizada a cirurgia são de extrema importância para o sucesso do procedimento de obtenção do modelo 2R1C. Neste modelo, a pressão distal do rim clipado não é restaurada de modo que essas células justaglomerulares estão em contínua ativação mantendo a produção e liberação de renina elevada e conseqüentemente a produção de AngII circulante (NAVAR *et al.*, 2002).

De fato, a contribuição crucial do SRA na fisiopatologia do modelo 2R1C e o modo em que o SRA sustenta o aumento da pressão sanguínea são semelhantes às condições comumente observadas em um grande número de indivíduos com hipertensão secundária, como a hipertensão arterial renovascular dependente de AngII (WANG; ZHANG; LIU, 2013; AMAT *et al.*, 2014).

Diferentemente do padrão observado nos diferentes modelos animais, os humanos com estenose da arterial renal mostram considerável variabilidade na concentração plasmática de renina, mas isso se dá devido ao grau de variabilidade nos graus de estenose, coexistência de morbididades, idade, ingestão de sódio e tratamento com antihipertensivos (LERMAN *et al.*, 2005). Além disso, ao contrário de humanos e ratos, os camundongos podem carrear um ou dois genes para renina, entretanto, a linhagem C57BL/6 (usada neste estudo) possui apenas um gene para renina (FIELD & GROSS, 1985).

1.2.1 Sistema-Renina-Angiotensina (SRA)

O SRA é uma cascata enzimática a qual é amplamente estudada. Primeiramente, Tiegerstedt e Bergman em 1898, identificaram uma substância pressora produzida pelos rins, denominada renina. Estudos subsequentes demonstraram que o SRA compreende um número de diversas enzimas, peptídeos e seus receptores (DRAPALA *et al.*, 2014). De modo geral, o início da cascata ocorre com a diminuição do fluxo renal com consequente ativação das células justaglomerulares, células encontradas na parede das arteríolas aferentes, que funcionam como mecanorreceptores. As células justaglomerulares ativadas liberam a renina, uma enzima que atua sobre o angiotensinogênio plasmático, uma α -globulina que é sintetizada principalmente no fígado, catalisando sua conversão em angiotensina I, um peptídeo de 10 aminoácidos que possui pequena ou nenhuma ação vasoconstritora. Em seguida, ocorre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), encontrada principalmente no tecido pulmonar, sobre a AngI, removendo dois aminoácidos e formando um octapeptídeo, a AngII. A AngII é um potente vasoconstrictor e peptídeo principal do SRA. Hoje em dia, sabe-se que os componentes do SRA são encontrados em diversos tecidos do organismo

(ROHRWASSER *et al.*, 1999; COHN & TOGNONI, 2001; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001; MORIMOTO *et al.*, 2002; STRAWN *et al.*, 2004).

A AngII é o componente ativo do SRA e os mecanismos de hipertensão induzidos por SRA são geralmente atribuídos aos efeitos diretos da AngII. A AngII é um peptídeo vasoativo com ação pleiotrópica, ou seja, atua em vários órgãos do organismo, tendo por efeito principal aumentar a resistência vascular periférica e conseqüentemente a pressão arterial, atuando também em outros órgãos que aumentam a pressão arterial, indiretamente. Atua diretamente na constrição das células do músculo liso vascular, aumentando a contratilidade do miocárdio, estimulando a produção do mineralocorticoide aldosterona e a liberação de catecolaminas da medula adrenal e terminações nervosas simpáticas na vasculatura. Além disso, a AngII é um potente agente estimulador da sede e apetite por sal levando a um aumento do volume sanguíneo. Algumas dessas ações contribuem para o aumento da resistência vascular periférica e da pressão arterial. Já foi demonstrado que a da AngII possui um papel direto na fomentação da hipertensão e de outros mediadores mais efetivos que contribuem também para as respostas a longo prazo (NAVAR *et al.*, 1998; KOBORI *et al.*, 2007; AMAT *et al.*, 2014).

A AngII pode se ligar a dois tipos de receptores celulares, AT₁ e AT₂. Atuando diretamente nos receptores AT₁, a angII desencadeia seus efeitos clássicos no sistema cardiovascular e renal de vasoconstrição arterial sistêmica, estimulando a reabsorção de sódio e água pelo túbulo renal e aumentando a secreção de aldosterona pela glândula renal. Por outro lado, os efeitos desencadeados pela sua interação com o receptor AT₂, ainda não são bem definidos. Estudos sugerem que esta interação possui efeitos opostos ao do AT₁, como por exemplo, a inibição do crescimento celular, promoção da natriurese e da produção de prostaglandinas, o que previne uma vasoconstrição excessiva da circulação sistêmica e renal (HEENEMAN *et al.*, 1997; VALLOTTON *et al.*, 1989; SAYER; BHAT, 2014). Os efeitos diretos e indiretos da AngII podem ser observados no esquema da figura 2.

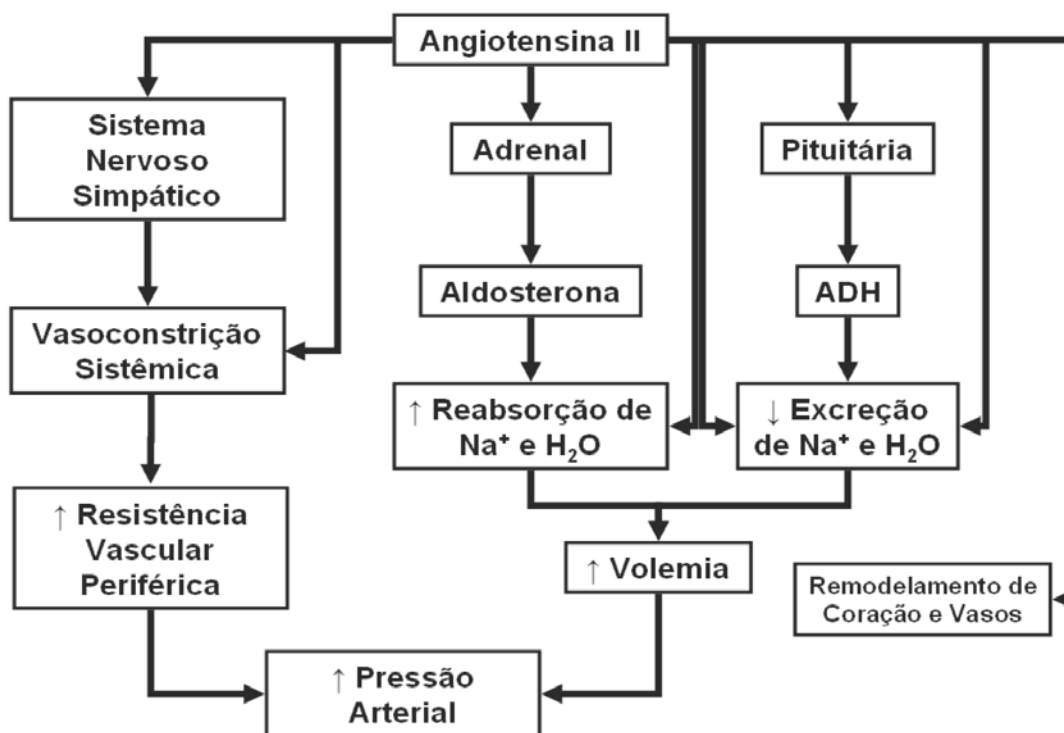


Figura 2: Esquema representativo dos efeitos hemodinâmicos da angiotensina II. ADH: hormônio antidiurético. Fonte: CAMPAGNARO, 2012.

No modelo murino de hipertensão renovascular 2R1C, o desenvolvimento da hipertensão é acompanhado por um significativo aumento dos níveis de AngII intrarenal, tanto no rim clipado quanto no rim não clipado. Estudos demonstram que o aumento na concentração de AngII circulante é capaz de elevar a concentração de AngII intrarenal via receptor AT_1 a níveis que excedem os níveis plasmáticos e que este aumento pode persistir até mesmo após a redução dos níveis plasmáticos de AngII. Com o aumento progressivo da pressão sanguínea, a pressão de perfusão e o fluxo para o rim clipado são restaurados. O rim contralateral não clipado, é submetido a elevações da pressão arterial, evento que leva a diminuição da produção e liberação de renina e possivelmente à um aumento na excreção de sódio devido ao fenômeno de natriurese pressórica. Entretanto fisiologicamente seria necessário apenas um rim normal para manter o balanço hidro-salino e pressão arterial normal, e por isso, o ponto chave deste modelo está na inabilidade do rim não clipado de prevenir o desenvolvimento da hipertensão. O rim contralateral, não clipado, aumenta a expressão de RNA mensageiro para angiotensinogênio e a atividade da ECA intrarenal com aumento ou manutenção da produção de AngII intrarenal, mesmo com baixa produção de renina (NAVAR *et al.*, 1998, 2002; SADJADI *et al.*, 2005). Tem-se

observado que o SRA circulante é responsável por processos agudos, enquanto a ativação do SRA tecidual está envolvida na resposta de um processo crônico, como um remodelamento estrutural secundário ao sistema cardiovascular (WANG; ZHANG; LIU, 2013). É possível observar de forma resumida na figura 3, os efeitos da estenose arterial no modelo 2R1C.

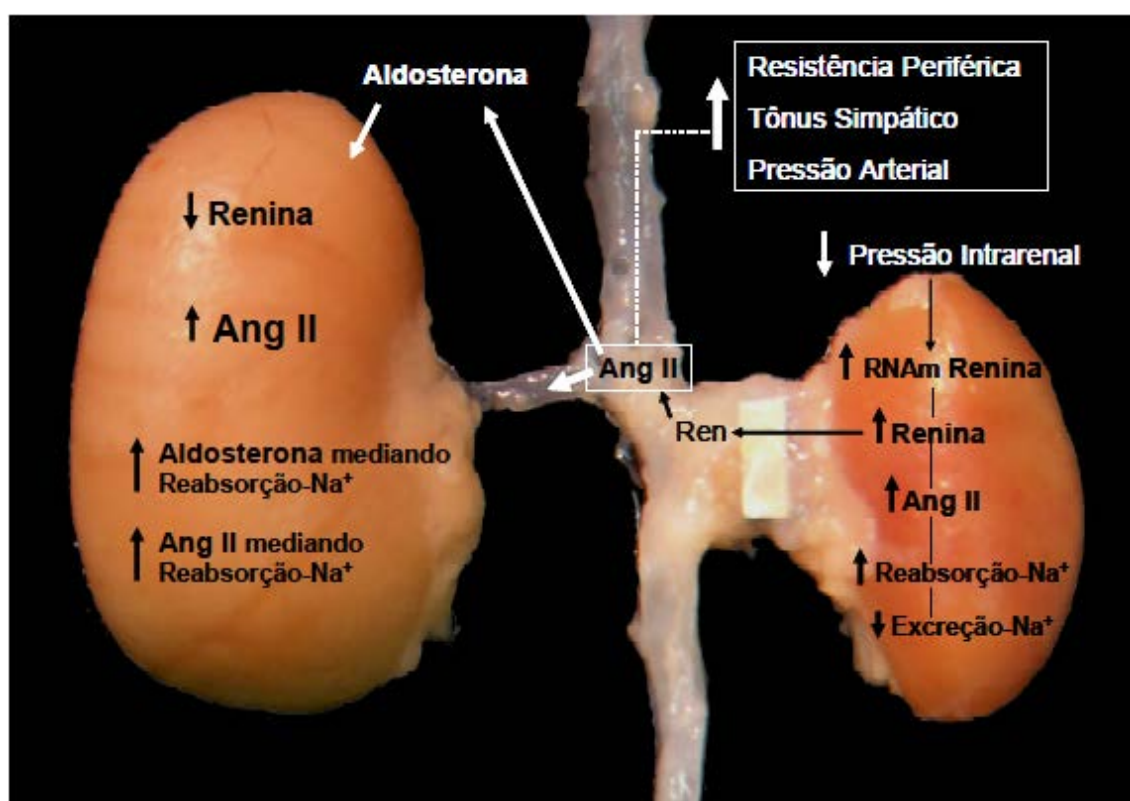


Figura 3: Efeito da estenose arterial no modelo 2R1C. Fonte: NOGUEIRA, 2008

Outros estudos sugerem que a Ang II não possui apenas ação como hormônio vasoativo, regulando a pressão arterial e a homeostase eletrolítica por seus efeitos hemodinâmicos, mas que atua também como fator de crescimento influenciando a proliferação/apoptose celular, levando ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), aumentando o estresse oxidativo e imunomodulando respostas inflamatórias. Esses efeitos não hemodinâmicos da AngII também são indispensáveis para instalação da hipertensão no que tange os danos causados a órgãos-alvo (TOUYZ, 2003, 2005; FERRARIO, 2006; RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2001). A figura 4 apresenta um esquema resumido das ações não-hemodinâmicas da AngII.

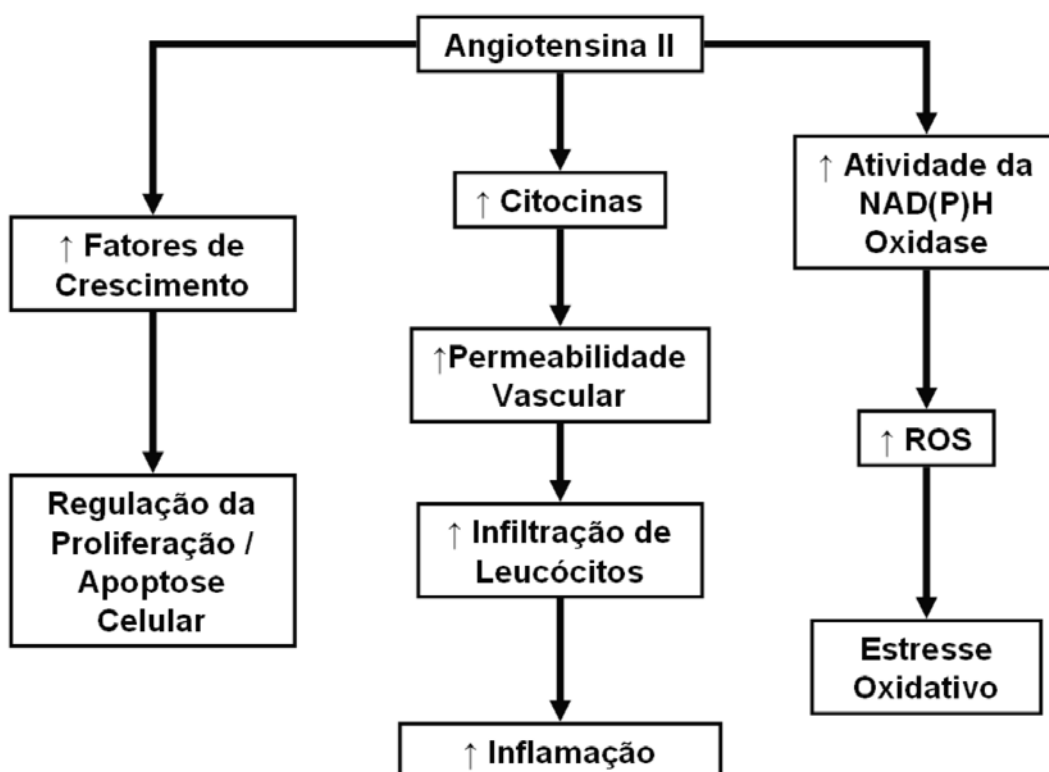


Figura 4: Efeitos não-hemodinâmicos da Angiotensina II. Fonte: CAMPAGNARO, 2012

1.2.2 Angiotensina-(1-7)

Santos e colaboradores em 1988, descrevem a formação de um heptapeptídeo de angiotensina, Ang-(1-7), a partir da Ang I por uma via independente da ECA. Estudos subsequentes (SCHIAVONE *et al.*, 1988; CHAPPEL *et al.*, 1989; SANTOS *et al.*, 1989) levaram ao reconhecimento da Ang-(1-7) como um peptídeo biologicamente ativo do SRA (SANTOS *et al.*, 2013).

A identificação da ECA2, como uma enzima chave na formação da Ang-(1-7) desvendou a existência de uma via enzimática para a produção deste peptídeo (DONOGHUE *et al.*, 2000; OCARANZA *et al.*, 2006).

A Ang-(1-7) pode ser formada à partir da Ang I por duas formas. Por ação da ECA2, que leva a formação da Ang-(1-9) sofrendo ação posterior da ECA ou NEP para formar Ang-(1-7), ou por ação direta da PEP ou NEP, levando a formação da Ang-(1-7). Ainda pode ser formada à partir da Ang II por ação da ECA2 e subsequente da PEP ou PCP. Aparentemente, a formação de Ang-(1-7) diretamente da Ang II é fisiologicamente e bioquimicamente mais relevante. Portanto, a ECA2 desempenha

papel crucial como regulador endógeno do SRA, uma vez que degrada Ang II, um peptídeo vasoconstrictor/proliferativo, e produz Ang-(1-7), um peptídeo vasodilatador/antiproliferativo.

Outro importante passo para estabelecer a importância da Ang-(1-7) foi alcançado com a identificação do receptor acoplado a proteína G, MAS. Este achado confirmou evidências de estudos prévios (CAMPAGNOLE-SANTOS *et al.*, 1992; AMBUHL *et al.*, 1994) que sugerem que este peptídeo exerça suas funções através da ligação a receptores diferentes de AT₁ e AT₂.

A Ang-(1-7) exerce várias funções, por exemplo, aumenta a sensibilidade do barorreflexo, diminui a ação simpática, possui ação antiproliferativa celular e é vasodilatadora, enquanto a Ang II diminui a sensibilidade do barorreflexo, estimula o sistema simpático, tem efeitos proliferativos e é vasoconstrictor (SANTOS *et al.*, 1988; FERRARIO, 1998). Portanto, é aceito atualmente que o eixo ECA₂→Ang-(1-7)→MAS é capaz de contrabalancear os efeitos do eixo ECA→Ang II→AT₁, especialmente em situações patológicas como a hipertensão arterial (SANTOS *et al.*, 2013).

1.2.3 Hipertensão e Estresse oxidativo

O endotélio (camada interna dos vasos sanguíneos) foi originalmente considerado uma barreira passiva entre o sangue e a parede vascular. Essa definição foi alterada após a descoberta da prostaglandina X (PG X) por Bunting e colaboradores em 1976, que mostrou que a parede arterial é capaz de sintetizar e liberar substâncias vasoativas com capacidade de relaxamento de tiras arteriais e de inibir a agregação plaquetária. A PG X foi identificada como PGI₂ (prostaciclina), uma substância sintetizada e liberada pelas células endoteliais. Contudo, somente após a descoberta da atuação do endotélio no relaxamento vascular através de um composto não identificado chamado de “fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)” por Furchgott e Zawadzki em 1980 que, posteriormente foi identificado ser o óxido nítrico, iniciou-se a era da “pesquisa endotelial”. Rapidamente foi descoberto que a PGI₂ e o NO não eram as únicas substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio.

Atualmente, já é sabido que o endotélio produz várias substâncias coletivamente denominadas de EDRF e EDCF (fatores constrictores derivados do endotélio), baseado na sua função em modular a parede vascular. O endotélio

vascular é um tecido capaz de controlar importantes funções nos vasos, incluindo a regulação do tônus vascular, homeostasia local, processos proliferativos, manutenção da circulação sanguínea, fluidez, coagulação e a resposta inflamatória e imune (AVERSA, 2008; BERNATOVA, 2014).

A regulação do tônus e da estrutura dos vasos sanguíneos ocorre por meio da produção e liberação contínua de substâncias vasoativas de ação parácrina e autócrina, como o óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs), endotelina-1 (ET-1), Angiotensina II (AngII), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina (PGI₂) e ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs). O estresse de cisalhamento e acetilcolina (ACh), são comumente utilizados para avaliar a função endotelial, assim como outras substâncias, que levam ao aumento do Ca⁺⁺ intracelular. A elevação do Ca⁺⁺ intracelular ativa a enzima NO sintase (eNOS), que a partir da sua ação na L-arginina promove a produção de NO. Essa reação requer a ação de outros cofatores, como tetrahydrobiopterina (BH₄) e NADPH que são importantes para a redução do oxigênio molecular (O₂) e oxidação da L-arginina, e consequentemente para a produção de NO e L-citrulina (MEYRELLES *et al.*, 2011).

O sistema de produção de NO também produz EROs, nos quais podemos incluir os radicais livres, ânion superóxido (O₂⁻) peroxinitrito (ONOO⁻), radicais hidroxil (OH⁻) e os não radicais como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As EROs podem ser produzidas pelas mitocôndrias, eNOS desacopladas, e várias oxidases como, Xantina oxidase, COX, lipoxigenases e CYP oxigenases. Além disso, a NADPH oxidase se mostrou como fonte primária dos chamados destas espécies conhecidas como “radicais inflamatórios” (MEYRELLES *et al.*, 2011; AMAT *et al.*, 2014; BERNATOVA *et al.*, 2014). É possível observar na figura 5 um esquema de uma célula endotelial com o esquema de produção de NO, bem como os estímulos para esta produção, a produção das EROs bem como a interação das substâncias produzidas com a célula do músculo liso, também representada.

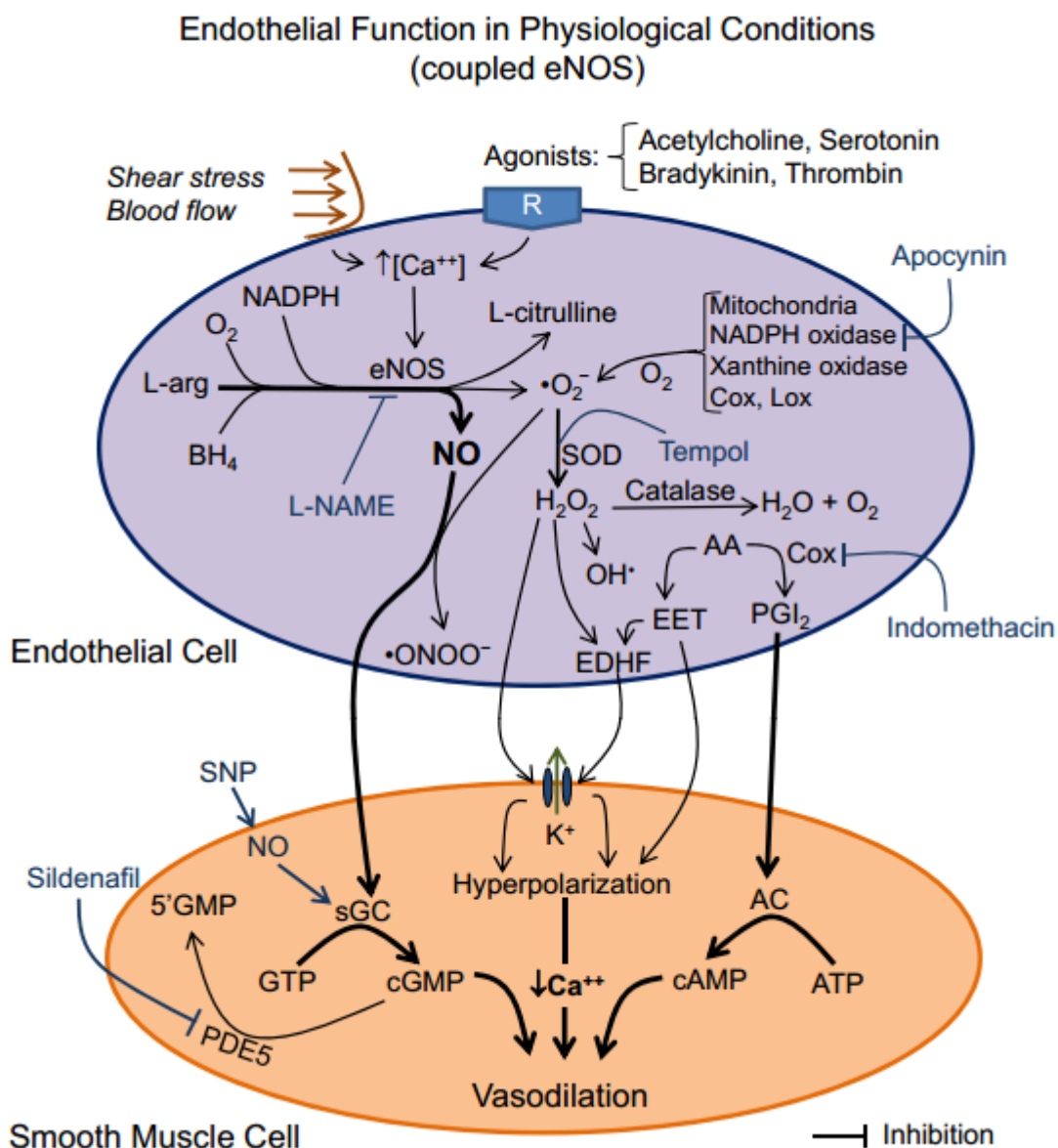


Figura 5: Esquema representativo das reações que ocorrem nas células endoteliais, bem como seus estímulos e ações dos seus produtos nas células musculares lisas. Fonte: MEYRELLES *et al.*, 2011

Além do balanço entre EROs e NO, existe uma complexa interação com os fatores derivados do endotélio com o objetivo de manter a função do endotélio apropriada. Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a produção de EROs e sua metabolização ou eliminação. Em situações patológicas, há um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes nos sistemas cardiovascular e renal, resultando no fenômeno conhecido com estresse oxidativo. Estudos recentes têm demonstrado o papel das EROs na hipertensão e como o estresse oxidativo induzido por EROs podem estar envolvidos na patogênese da hipertensão. As EROs podem agir no tecido vascular e renal, alterar a função cardíaca, influenciar o crescimento celular que

modula a estrutura tecidual, além de interferir na resposta inflamatória via sinalização redox-dependente. Laerman e colaboradores demonstraram em modelo porcino um aumento da atividade da renina plasmática e pressão arterial estava associado ao aumento do estresse oxidativo. Desse modo, os radicais livres podem participar na fisiopatologia da hipertensão prejudicando órgãos-alvo através de diferentes vias (LAERMAN *et al* 2001; TOUYZ, 2004; MONTEZANO; TOUYZ, 2012; AMAT *et al.*, 2014; BERNATOVA, 2014).

A relação entre o desenvolvimento da hipertensão e o aumento da biodisponibilidade das ROS e/ou diminuição da capacidade anti-oxidante, tem sido avaliada em muitos modelos experimentais de hipertensão que se assemelham à hipertensão humana. Em geral, esses estudos são baseados, no aumento dos níveis dos biomarcadores de peroxidação lipídica e estresse oxidativo (HARRISSON *et al.*, 2009; TOUYZ, 2004; CERIELLO, 2008). Um destes estudos demonstrou um marcante aumento da peroxidação lipídica em pacientes com hipertensão renovascular com relatada ativação do SRAA e estresse oxidativo aumentado tendo um parcial prejuízo da função endotelial (MINUZ *et al.*, 2002; HIGASHI *et al.*, 2002).

Um grande número de radicais livres de oxigênio tem a capacidade de interagir com macromoléculas como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, destruindo ou alterando a função destes compostos e causando citotoxicidade, mutagênese e até a morte celular (MATÉS *et al.*, 1999) As EROs podem interagir com lipídios podendo causar a peroxidação lipídica e minar a membrana celular de ácidos graxos insaturados por formação de peróxidos de lipídio trazendo dano a estrutura celular (AMAT *et al.*, 2014).

Portanto, em condições fisiológicas normais temos que a produção de EROs é contrabalanceada pela ação dos mecanismos antioxidantes do organismo. Entretanto em algumas situações patológicas, como a hipertensão, ocorre um desequilíbrio na produção/consumo dessas substâncias acentuando o processo fisiopatológico bem como o agravando. Assim, a proteção endotelial contra a injúria de radicais livres é muito importante no tratamento da hipertensão.

1.3 Inibidores da Fosfodiesterase (Sildenafil)

O NO produzido nas células endoteliais se difunde através das células do músculo liso vascular (VSCM), onde ele ativa a enzima guanilil ciclase solúvel Esta

enzima ativada produz o mensageiro intracelular guanosina monofosfato cíclico (GMPc) a partir de guanosina trifosfato (GTP), o que leva à diminuição dos níveis de Ca^{++} e conseqüentemente, o relaxamento do VSCM. Portanto, a via de sinalização NO/GMPc apresenta um importante papel no relaxamento vascular e na regulação da pressão arterial.

A degradação do GMPc é dada devido à ação de enzimas da família das fosfodiesterases (PDEs), que compreendem uma gama de enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos. Estas são cruciais na modulação da sinalização citoplasmática desse tipo de mensageiro intracelular (RAJA & NAYAK, 2004). A isoforma PDE5 é a responsável pela degradação de maneira específica do GMPc e está presente em grande concentração em um número limitado de tecidos, sendo estes o coração, músculo liso vascular sistêmico, corpo cavernoso do pênis, plaquetas e músculo liso visceral (GLOSSMANN *et al.*, 1999; STEGBAUER *et al.*, 2013).

Os inibidores das fosfodiesterases (PDEs) elevam os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos. Fisiologicamente, existe uma gama de isoformas na família das PDEs, e por isso, inibidores seletivos destas enzimas são ferramentas farmacológicas promissoras. Neste contexto, o sildenafil se destaca por apresentar alta seletividade à PDE5 (GLOSSMANN *et al.*, 1999; RAJA & NAYAK *et al.*, 2004).

O sildenafil é amplamente usado na clínica para tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar. Tem como função prolongar os efeitos do segundo mensageiro GMPc na via NO/GMPc, através da inibição da hidrólise deste composto, prolongando sua ação. Alguns estudos têm demonstrado que o sildenafil promove melhora da função endotelial em condições de doença arterial coronariana (HALCOX *et al.*, 2002), assim como na diabetes, reduzindo o estresse oxidativo em vários tecidos (MILANI *et al.*, 2005; PATIL; SINGH; KULKARNI, 2006; AVERSA *et al.*, 2008). 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 (BIVALACQUA *et al.*, 2009) e remodelamento vascular (KOYAMA *et al.*, 2001). 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 (BALARINI *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013; DIAS *et al.* 2014).

Portanto, mediante o exposto, este estudo tem como proposta investigar a eficácia do sildenafil na função contrátil do modelo murino de hipertensão renovascular 2R1C e conseqüentemente avaliar se este tratamento é capaz de reduzir os danos provocados pelo aumento do estresse oxidativo e ativação do SRAA. Visto que a hipertensão apresenta alta incidência na população, altos índices de morbidade e que existem poucos dados que relatam a relação desta doença com o sildenafil, este trabalho tem potencial de contribuir para a elucidação de uma possível alteração na função vascular dos camundongos submetidos a hipertensão vascular, além de avaliar os possíveis efeitos benéficos do tratamento deste tipo de hipertensão com o sildenafil, que podem levar a uma futura alternativa de tratamento da hipertensão renovascular.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar em camundongos com hipertensão renovascular os efeitos do tratamento crônico com sildenafil sobre a função vascular contrátil.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Comparar o efeito do tratamento sobre os parâmetros ponderais;
- Verificar o efeito do tratamento sobre a PAM e FC;
- Avaliar a reatividade vascular do Leito Aórtico e LVM;
- Estudar a participação do endotélio no mecanismo contrátil;
- Estudar a participação da EROs no mecanismo contrátil;
- Verificar o efeito do tratamento sobre os níveis plasmáticos das frações de Angiotensina;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre os níveis de peroxidação lipídica.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Durante o desenvolvimento do presente estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos, machos, da linhagem C57BL/6, de 8 semanas de idade com aproximadamente 23 gramas.

Os animais foram mantidos no biotério de pesquisa do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram criados e manuseados de acordo com o Guia para Manutenção de Uso de Animais de Laboratório do *National Institute of Health* (NIH) e com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola de Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia (CEUA-EMESCAM, protocolo número 02/2013). Sendo assim, foram acondicionados em gaiolas individuais em estante com controle de circulação de ar (Alesco, São Paulo, Brasil), com controle do ciclo claro/escuro de 12/12horas, sob temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e tiveram acesso a água e ração *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais

Ao atingirem o peso de 23 gramas, aproximadamente, os animais eram separados, aleatoriamente, nos seguintes grupos experimentais:

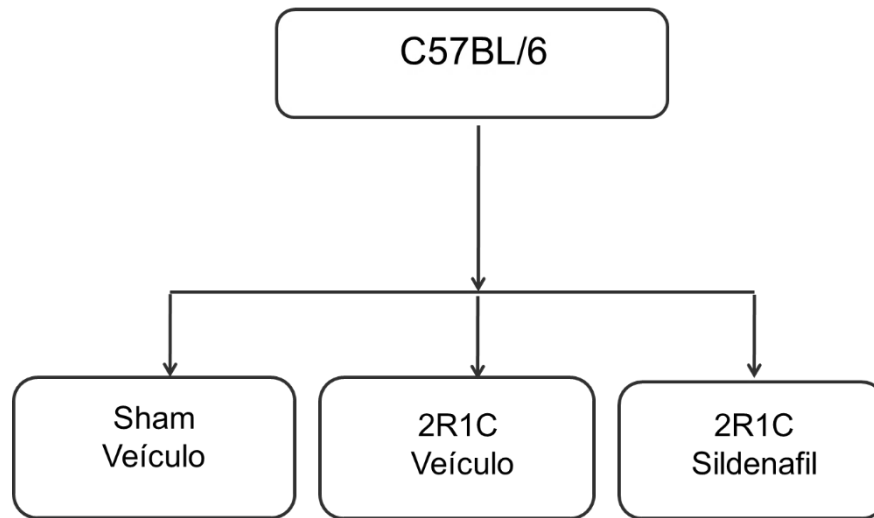


Figura 6: Esquema representativo do protocolo experimental

3.3 Obtenção da Hipertensão Renovascular Experimental 2 Rins 1 Clipe (2R1C)

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina/Xilazina (91/9,1 mg/Kg) i.p. Após serem colocados em decúbito lateral direito, e após tricotomia do dorso lateral, com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto eletrônica S/A Sn – 2002, São Carlos, SP), foi realizada laparotomia Lombo-Abdominal para que o rim esquerdo fosse exposto. Após um cuidadoso e completo isolamento da artéria renal esquerda, um clipe de aço inox (Exidel SA, Suíça), desenvolvido exclusivamente para camundongos (3x2x1 mm com 2 mm de comprimento e 0,12 mm de abertura), foi colocado, próximo a aorta abdominal provocando estenose renal parcial. Em seguida o rim era, cuidadosamente, realocado na cavidade retroperitoneal, a musculatura adjacente suturada com linhas *catgut* simples e a pele com fios de algodão. Nos animais do grupo controle, o mesmo procedimento foi realizado, exceto a colocação do clipe na artéria renal, o que denominamos de cirurgia fictícia ou falso operado (*sham operated*).

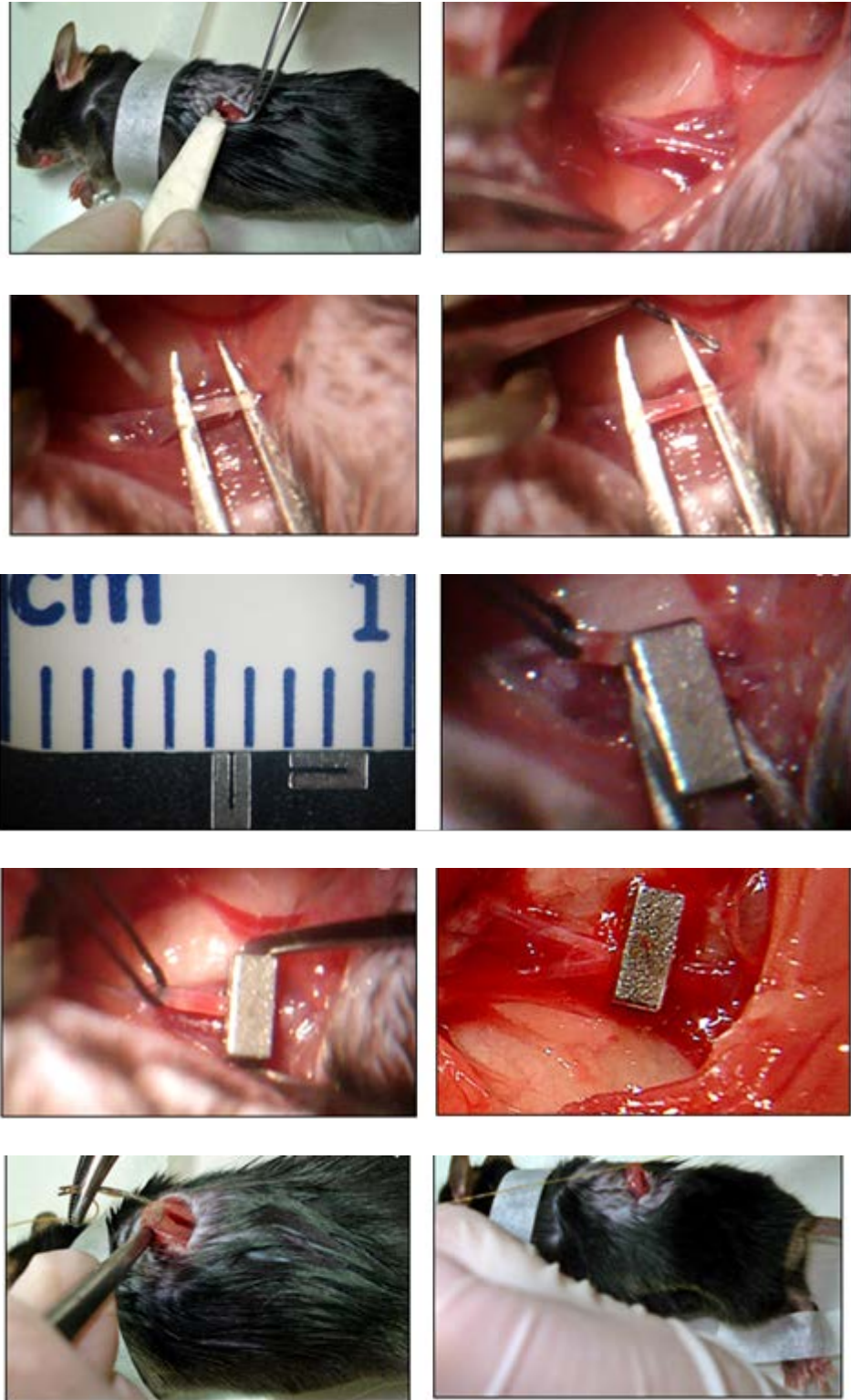


Figura 7: Demonstração da implantação do clipe na artéria renal do rim esquerdo. Fonte: Campagnaro, 2012

3.4 Tratamento dos animais

Duas semanas após a cirurgia para implantação do clipe, os animais eram então divididos em dois subgrupos. Um (2R1C Sildenafil), tratado com doses de sildenafil, obtidos da trituração de comprimidos de viagra® (Pfizer, São Paulo, Brasil), na dose de 40mg/kg/dia por via oral (gavagem), durante duas semanas. O volume administrado foi ajustado diariamente, de acordo com o peso dos animais. O outro subgrupo (2R1C) recebeu veículo (água) no mesmo volume que os animais tratados com sildenafil. Os animais do grupo controle (Sham) também receberam veículo do mesmo modo que os animais do grupo 2R1C. O protocolo experimental está esquematizado a seguir.

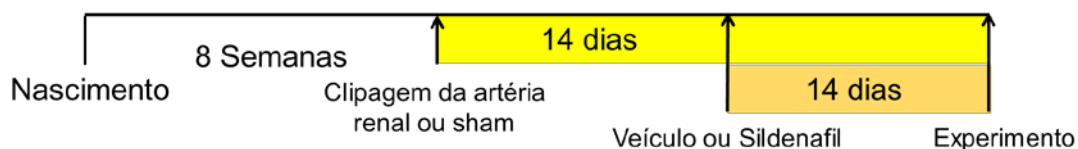


Figura 8: Representação esquemática do protocolo de tratamento utilizado

3.5 Medidas hemodinâmicas

Cateteres de 4 a 5 cm de comprimento (Micro-Renathane, Braintree Science, USA, 0,040mm O.D. – 0,025mm I.D.) tiveram redução do seu diâmetro por aquecimento. Posteriormente, foram preenchidos com solução de salina/heparina (50:1) para evitar coagulação quando inseridos na artéria dos animais.

Dois dias antes do final do tratamento com sildenafil ou veículo, os camundongos foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (91/9,1 mg/Kg) i.p. e posicionados em uma manta térmica. Uma incisão cervical permitiu o acesso à artéria carótida direita que foi cuidadosamente isolada com auxílio de lupa cirúrgica (Opto Eletrônica SA, Sn – 2002. São Carlos, SP). O cateter foi inserido no lúmen após incisão da artéria, e foi exteriorizado pelo dorso com auxílio de um trocater, posteriormente as incisões foram suturadas.

Após 48 horas, com os animais acordados e livres dentro da gaiola, tiveram os cateteres conectados a um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, USA) conectado a um pré-amplificador de um sistema de aquisição de dados (Biopac System, Santa

Barbara, CA, USA) para obtenção dos registros de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

3.6 Parâmetros biológicos

Para obtenção dos parâmetros biológicos, ao final do protocolo experimental, os animais sofreram eutanásia (tiopental 200mg/kg, i.p.) e tiveram os rins e coração isolados, limpos com solução fisiológica e mantidos em estufa sob a temperatura de 37°C por 24 horas para determinação do peso seco. Para verificar se houve hipertrofia cardíaca foi realizada a razão do peso seco do coração pelo comprimento da tibia. Para verificar se houve hipertrofia renal foi realizada a razão do peso seco do rim direito pelo peso seco do rim esquerdo.

3.7 Estudos de função vascular

3.7.1 Reatividade do leito aórtico

O protocolo foi realizado de acordo com trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (BALLARINI, *et al.*, 2013).

Ao final do período experimental os animais foram eutanasiados (tiopental 40mg/kg, i.p.) e foram submetidos à taracotomia para exposição do coração e aorta, os quais foram cuidadosamente dissecados do tecido conjuntivo e retirados do animal. As peças foram colocadas em placa de Petri, contendo solução de Krebs modificada (concentrações, em mM: NaCl 115; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; EDTA 0,1; glicose 11,1), pH 7,4.

A aorta torácica foi limpa do tecido conjuntivo e cortada em 3 ou 4 anéis de aproximadamente 3 milímetros cada. Em seguida, conforme esquematizado na figura 9, os anéis foram acoplados, por meio do lúmen vascular, a triângulos de aço inoxidável de forma a permanecerem paralelos. Então, foram acondicionados em cuba de vidro de 5 mL de volume, contendo a mesma solução nutritiva de Krebs, constantemente aerada por mistura carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂ e mantida sob temperatura de 37°C com o 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 eram captadas e enviadas a um computador.

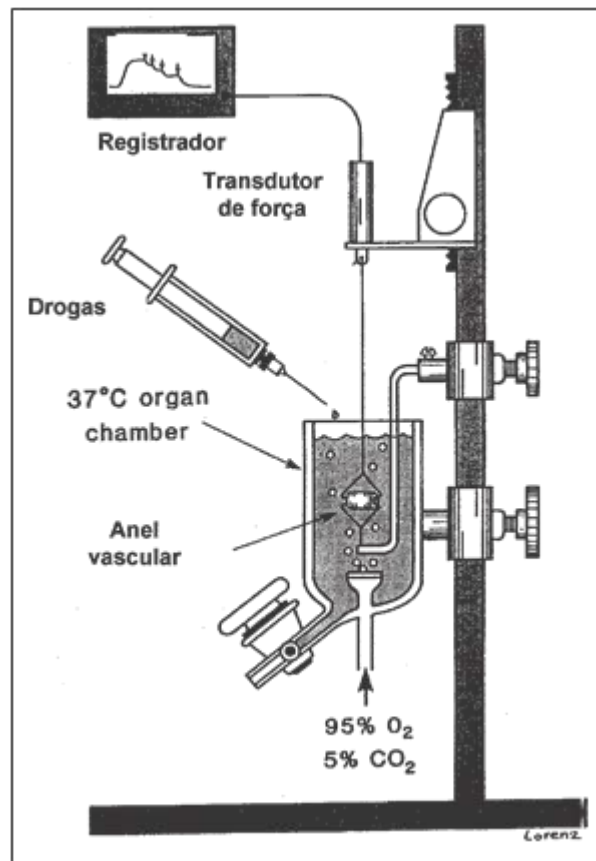


Figura 9: Representação esquemática dos banhos orgânicos utilizados para o estudo da reatividade vascular

3.7.1.1 Avaliação da Viabilidade dos Anéis e Teste do Endotélio

Em seguida à montagem do sistema, os anéis foram gradativamente submetidos a uma tensão basal de 0,5 gramas, reajustada quando necessário. Seguido o período de estabilização de 60 minutos, a viabilidade dos anéis foi avaliada após administração de 125 mM de KCl (figura10), o qual devia gerar uma contração por despolarização de, pelo menos, o dobro do valor basal de tensão. Em seguida, após a troca da solução nutritora e estabilização de 30 minutos, a contração máxima de cada peça foi avaliada após adição com 125 mM de KCl por 30 minutos.

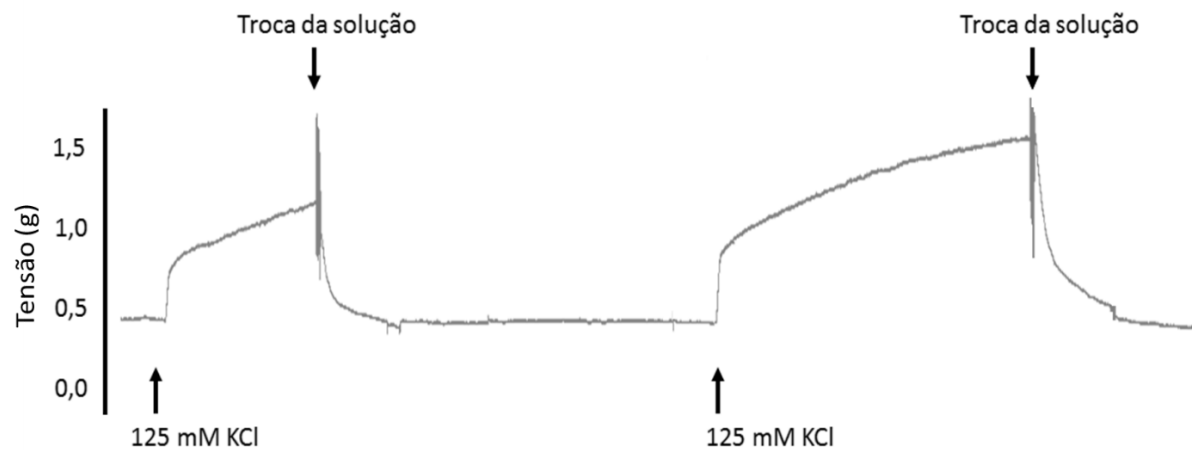


Figura 10: representação esquemática da avaliação da viabilidade dos anéis, construída a partir de um registro típico experimental. Após a primeira administração de 125 mM de KCl gerando contração de pelo menos o dobro da contração basal. Após período de estabilização de 30 minutos, foi administrada nova dose de 125 mM de KCl provocando contração máxima registrada 30 minutos após administrada a dose de KCl.

Assegurada a viabilidade dos anéis, teve seguimento o teste de integridade do endotélio vascular (figura11). A cada anel, adicionou-se 10 μ M do agonista alfa adrenérgico fenilefrina (Phe). Em seguida, o relaxamento vascular dependente do endotélio foi induzido a partir da adição do agonista de receptores muscarínicos acetilcolina (ACh). O endotélio foi considerado íntegro quando se registrou um relaxamento igual ou superior a 50% da contração induzida pela Phe. Os anéis que apresentaram relaxamento inferior a 50% foram descartados.

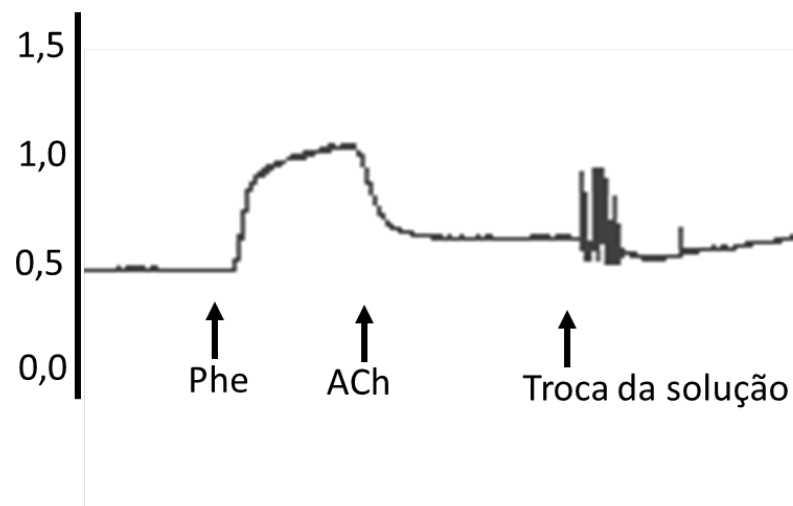


Figura 11: Representação esquemática da avaliação da integridade do endotélio, construída a partir de um registro típico experimental. Phe: administração de 10 μ M de Phe, ACh: administração de 10 μ M de ACh.

3.7.1.2 Protocolos de Reatividade Vascular

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 eram submetidos a doses crescentes de substâncias vasoativas, permitindo o registro da variação de tensão em função do tempo.

A escolha das drogas utilizadas foi delineada com o objetivo de avaliar a presença ou não de hiper-reatividade dos vasos após obtenção da hipertensão renovascular bem como a melhora esperada após o tratamento destes animais com o sildenafil.

Neste caso, a avaliação da presença de hiper-reatividade foi realizada por meio da construção de curva de contração dos anéis frente à administração de doses crescentes de Phe (10^{-10} a 3×10^{-5} M)

3.8 Reatividade do Leito Vascular Mesentérico

O protocolo foi realizado de acordo com trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (ARRUDA, *et al.*, 2005).

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/kg) i.p. Após laparotomia abdominal, a artéria mesentérica superior foi cuidadosamente isolada e canulada com cateter de polietileno (PE50). O mesentério foi dissecado das alças intestinais, evitando-se o estiramento excessivo, para evitar qualquer tipo de lesão. O leito então, foi imediatamente perfundido com solução nutritora de Krebs modificado (NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄.7H₂O 1,17mM; CaCl₂.H₂O 1,60 mM; KH₂PO₄ 1,18mM; NaHCO₃ 14,90 mM; EDTA 0,02Mm; Glicose 11,10mM) numa velocidade constante de 3,0ml/min, gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), mantida a 37± 0,5°C, usando uma bomba peristáltica (Peri Star Pro, World Precision Instruments, Sarasota, USA). As alterações na pressão de perfusão foram detectadas por transdutor de pressão (Cobe Laboratories, Lakewood, CO, USA) conectado a um amplificador de pressão e registrado por um sistema de aquisição de dados (BioPac Systems, Holliston, MA, USA).

Nesse estudo, primeiramente foi realizada a Curva Concentração Efeito ao agente vasoconstrictor agonista α 1-adrenérgico Norepinefrina (NOR, Hipolabor, Minas Gerais, Brasil).

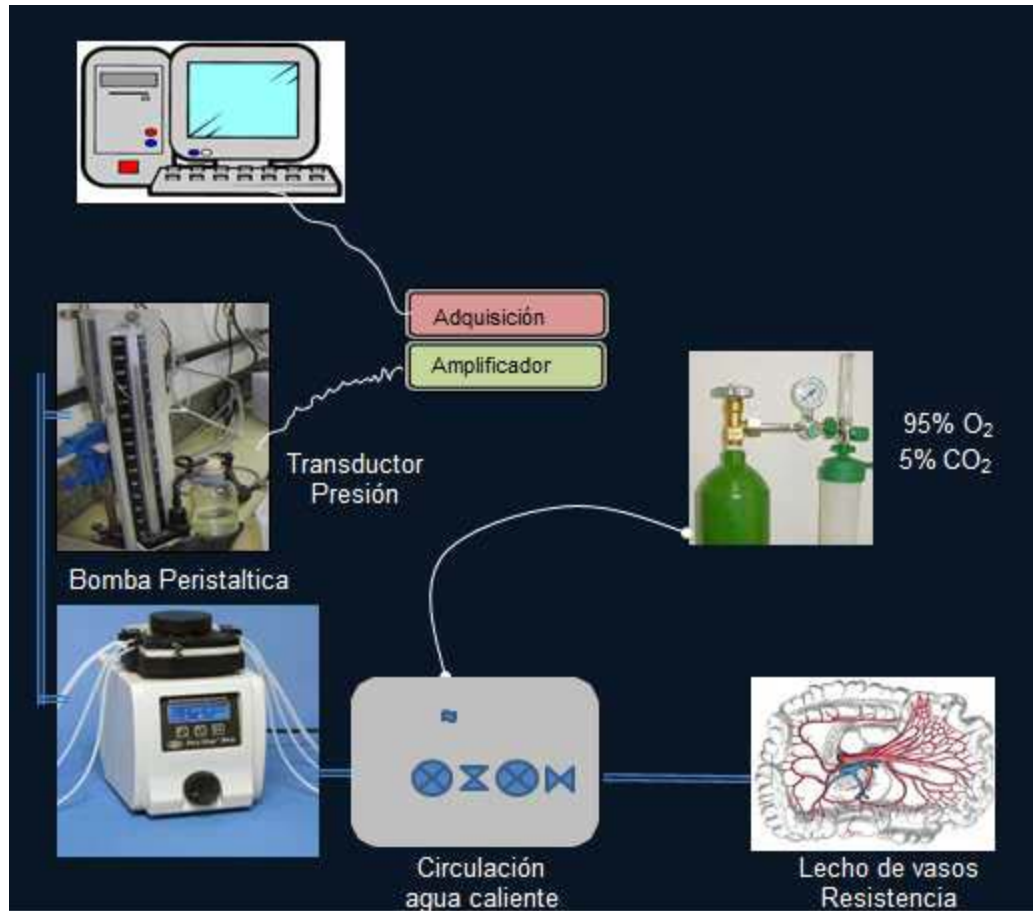


Figura 12: Esquema representativo do sistema utilizado para realização do estudo da reatividade. Fonte: Adaptado Vasquez, 2013.

3.8.1 Reatividade do LVM ao vasoconstrictor NOR

Curvas dose-resposta foram realizadas no leito mesentérico vascular após período de estabilização (30 minutos). Primeiramente, o leito recebeu concentrações *in bolus* sequenciais e crescentes do agente vasoconstrictor norepinefrina (NOR, Hipolabor, Minas Gerais, Brasil, 10^{-8} a 10^{-3} mol/L). A figura 14 a seguir mostra um registro típico de uma curva dose-resposta a norepinefrina.

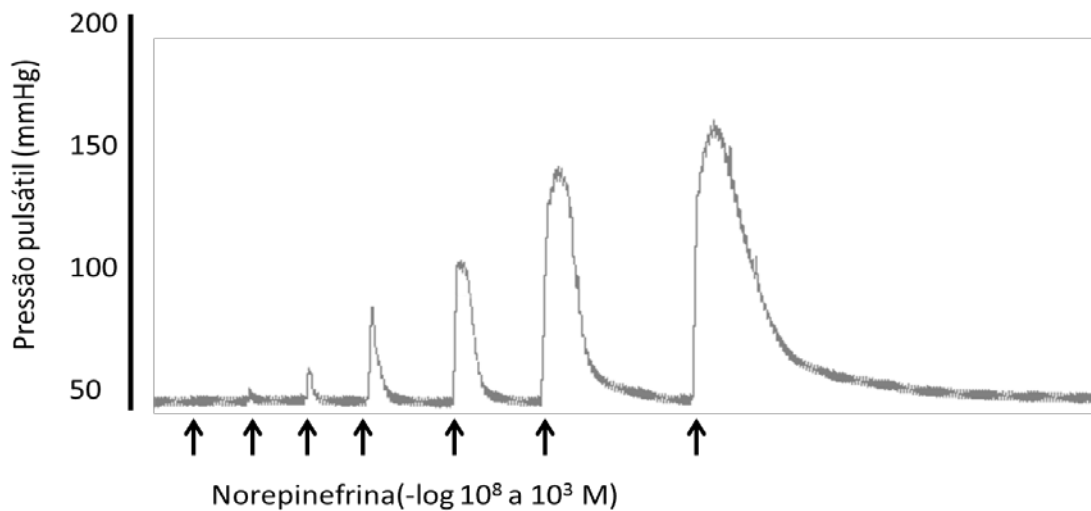


Figura 13: Representação típica de uma curva dose-resposta à noradrenalina

3.8.2 Avaliação da participação dos derivados do endotélio na contração do LVM

Para avaliar a participação dos derivados do endotélio na contração do LVM, uma CCE com doses crescentes de NOR foi administrada após remoção do endotélio vascular. Após realizar uma curva dose-resposta com o vasoconstrictor NOR o LVM passou por um período de estabilização (30 minutos), e foi perfundido com o volume de 3 ml de bolha de ar (TIMPONI *et al.*, 2006). Posteriormente passou por mais um período de estabilização (30 minutos) seguindo de uma nova curva dose-resposta com doses crescentes de NOR. Ao final da curva dose-resposta, ocorreu mais um período de estabilização (15 minutos) e realizou-se teste do endotélio para confirmar a remoção do endotélio vascular. Para tanto, realizou-se uma pré-contração induzida por NOR diluída em Krebs (8×10^{-5} M) para formação de um platô de contração. Após a formação do platô administrou-se uma dose de ACh (5×10^{-5} M) e calculou-se o percentual de relaxamento em relação a contração máxima à NOR. Foi confirmada a remoção do endotélio, quando registrou-se um relaxamento igual ou inferior a 30%. Caso o relaxamento fosse superior a este valor, a curva dose-resposta era descartada.

3.8.3 Avaliação da participação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na contração do LVM

Para verificar a influência de EROs produzidas pela NADPH oxidase na contração tecidual, após a curva dose-efeito com doses frequentes de NOR e período de estabilização, o leito vascular foi perfundido por 30 minutos com Apocinina (30 μ M), um inibidor da enzima NADPH oxidase. Após esse período foi realizada uma nova curva dose-efeito com doses crescentes de NOR.

3. 9 Dosagem de angiotensina plasmática

No momento em que os animais foram eutanasiados para realização dos protocolos de reatividade e o sangue foi rapidamente coletado através da cavidade torácica com uso de uma micropipeta que continha EDTA e adicionado a um microtubo (ependorf®) contendo 60 μ L de coquetel inibidor de proteases para uso geral (P2714, Sigma Aldrich) e 6 μ L de EDTA. O sangue foi delicadamente homogeneizado e centrifugado por quinze minutos, 3000 rpm, a 4°C. O plasma foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até a análise por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) no Departamento de Nefrologia da UNIFESP.

A extração das angiotensinas foi realizada em colunas C18 Sep-Pak previamente ativadas com metanol (5 mL), tetrahydrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas na mistura de etanol, ácido acético e água (90:4:6). Os eluatos foram liofilizados e redissolvidos em 500 μ L de fase móvel A (5% de acetonitrila em 0,1% de ácido ortofosfórico), e então filtrados com membrana de 0,22 μ m para serem analisados por HPLC.

Os peptídeos foram separados em coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), 7 μ m, utilizando 5 min de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC. A coluna de HPLC foi calibrada utilizando padrões sintéticos e a detecção dos peptídeos foi acompanhada em absorbância 214 nm. Os cálculos foram efetuados a partir de uma curva padrão de concentração conhecida.

3.10 Avaliação da peroxidação lipídica

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, sendo mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre os quais o malondialdeído (MDA) é o principal (PATOČKOVÁ *et al.*, 2003).

Para mensurar os metabólitos reativos ao TBA, ao final do protocolo experimental, alguns animais foram eutanasiados e tiveram seus leitos mesentéricos isolados e armazenados em freezer -80°C até a análise por espectrofotometria. Os leitos mesentéricos foram triturados com uma TESOURA CIRÚRGICA. Em um microtubo de ensaio (Eppendorf®) mantido no gelo, foram adicionados 100mg de tecido 500 µl de solução TCA (15%) e BHT (45 mM), os quais foram homogeneizados. As amostras foram mantidas em banho-maria fervente (100°C), por 15 minutos. Foram então centrifugadas a 15000g por 2 minutos e retirados 300 µl do sobrenadante. Em outro microtubo, adicionou-se o sobrenadante coletado e 300 µl de TBA (0,73%) com as amostras ainda quentes. Os microtubos foram novamente mantidos em banho-maria fervente (100°C) por 30 minutos. Em seguida, alíquotas de 200 µl de cada amostra foram lidas em leitor de ELISA na faixa de 540 nm. Para correção das absorbâncias um branco foi preparado somente com TCA, BHT e TBA.

Para o cálculo da concentração de MDA nas amostras utilizou-se a seguinte fórmula:

Concentração de MDA (nmol)= [Absorbância a 534 nm/ (coeficiente de extinção molar do MDAXcaminho óptico)] x diluição

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos com média ± erro padrão da média. As respostas das curvas concentração-resposta no leito aórtico foram expressas como porcentagem de contração em relação ao nível máximo de contração ao agente vasoconstrictor KCl. Para cada curva concentração-resposta, a resposta máxima (R_{max}) e o log da dose de agonista que produziu metade da R_{max} (log EC_{50}) foram calculados por regressão não linear (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A sensibilidade ao agonista foi expressa como p EC_{50} (-log EC_{50}).

As respostas das curvas dose-resposta no leito mesentérico vascular foram expressas como a diferença na pressão (mmHg) de perfusão do leito em relação ao nível basal. Nas curvas em que foram feitas manobras farmacológicas, alguns resultados estão expressos como a diferença entre as áreas abaixo das curvas antes e após a manobra farmacológica (ΔA_{uc}), representando a magnitude da manobra realizada.

As repostas para a dosagem das angiotensinas plasmáticas estão expressas como porcentagem em relação à presença destas proteínas comparadas ao grupo sham.

A resposta da avaliação da peroxidação lipídica está expressa em nmol de MDA por grama de tecido analisado.

Para análise estatística das curvas entre os grupos, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas, seguida pelo *post hoc* de Tukey. As comparações do R_{max} , pEC_{50} , parâmetros biológicos, medidas hemodinâmicas, dosagem de angiotensina e TBARS foi feita por ANOVA de 1 via seguido pelo *post hoc* de Bonferroni. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Medidas Hemodinâmicas

Conforme demonstrado na figura 15, os animais do grupo 2R1C apresentaram um aumento na pressão arterial ($127,9 \pm 3,8$) quando comparados com os animais do grupo SHAM ($105,2 \pm 2,4$). Observou-se também, que após o tratamento com sildenafil houve uma redução dos níveis pressóricos dos animais do grupo tratado ($114,7 \pm 2,4$) em relação ao grupo 2R1C. A figura 15 demonstra que os animais do grupo 2R1C apresentam taquicardia ($514,2 \pm 7,4$) quando comparados ao grupo SHAM ($441 \pm 9,7$) e que o tratamento com sildenafil diminuiu a taquicardia apresentada pelos animais hipertensos ($471,4 \pm 12$).

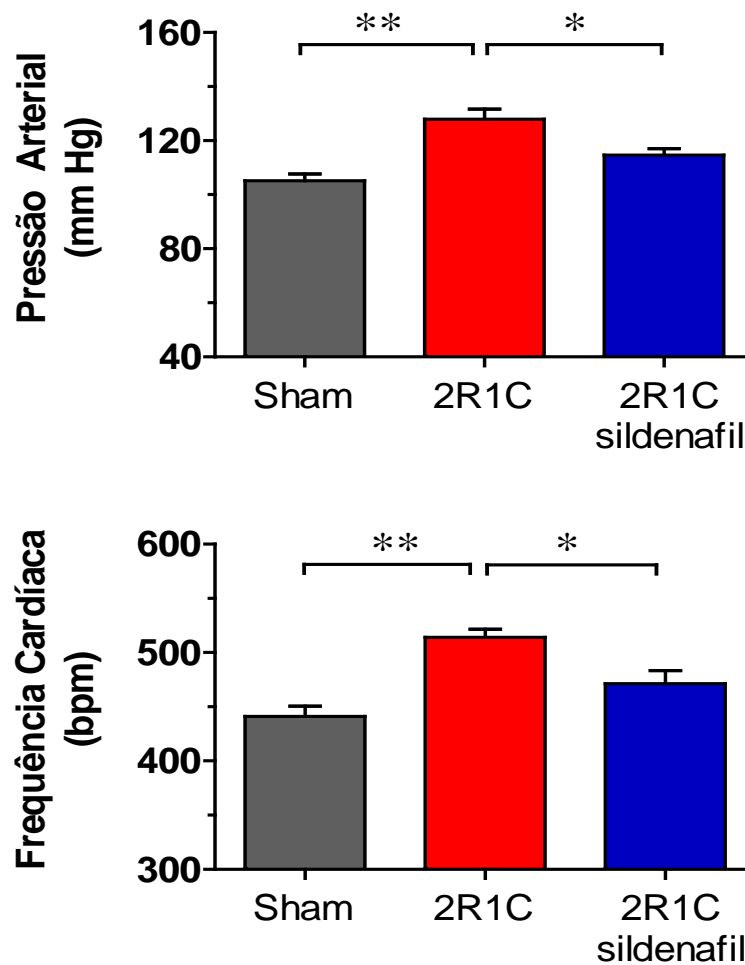


Figura 14: Efeito do sildenafil nos valores de repouso das médias de pressão arterial e frequência cardíaca no modelo de hipertensão renovascular 2R1C comparados com camundongos 2R1C não tratados e Sham. Valores expressos como média \pm EPM. $n=6$ por grupo. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$

4.2 Parâmetros biológicos

Os resultados da avaliação dos parâmetros biológicos, peso corporal, razão peso do rim clipado/peso do rim não clipado e razão do peso do coração/comprimento da tibia, estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Peso corporal e dos órgãos do modelo experimental

Parâmetros	Sham	2R1C	2R1C sildenafil
Peso corporal (g)	26 ± 0.5	24 ± 0,4*	25 ± 0,3
Rim clipado/Rim não clipado (mg)	0.93 ± 0.04	0.54 ± 0.09**	0.88 ± 0.06#
Peso do coração / comprimento da Tibia (mg/cm)	20.5±0.5	20.4 ± 1.3	20.1 ± 0.7

Valores expressos como média ± EPM. *p<0,05 2R1C vs. sham; #p< 0,05 2R1C vs. 2R1C sildenafil

Observou-se uma diminuição no peso dos animais do grupo 2R1C quando comparados com os animais do grupo SHAM. Essa diminuição foi abolida após o tratamento dos animais com sildenafil. A razão do peso do rim clipado/rim não clipado apresentou-se reduzida nos animais do grupo 2R1C quando comparados aos animais do grupo SHAM. Os animais tratados com sildenafil tiveram essa relação reestabelecida em relação ao grupo SHAM. Não se observou diferença na razão do peso do coração/comprimento da tibia.

4.3 Estudos da função vascular

4.3.1 Reatividade vascular

A figura 15 demonstra um comparativo entre a reatividade dos leitos mesentérico e aórtico.

A figura 15a que representa o leito aórtico, não se observou alteração na reatividade a PHE dos animais do grupo 2R1C em relação ao grupo SHAM (R_{MAX} : $55,27 \pm 1,56$ vs $59,57 \pm 1,97$ e pEC_{50} : $6,76 \pm 0,07$ vs $6,74 \pm 0,08$, respectivamente). Os animais do grupo 2R1Csildenafil apresentam redução na contração máxima R_{MAX} quando comparados ao grupo SHAM (R_{MAX} : $46,09 \pm 0,73$) e não apresentam diferença no valor de pEC_{50} ($6,8 \pm 0,04$).

Na figura 15b que representa o leito mesentérico, os animais do grupo 2R1C demonstram uma hiper-reatividade (R_{MAX}) frente ao vasoconstrictor NOR quando comparados aos animais do grupo SHAM ($162,4 \pm 14$ vs 118 ± 12 , respectivamente) sendo que o grupo 2R1Csildenafil, aboliu esta hiper-reatividade (116 ± 9).

A figura 16 representa registros típicos de curvas concentração-resposta nos diferentes grupos experimentais deste trabalho.

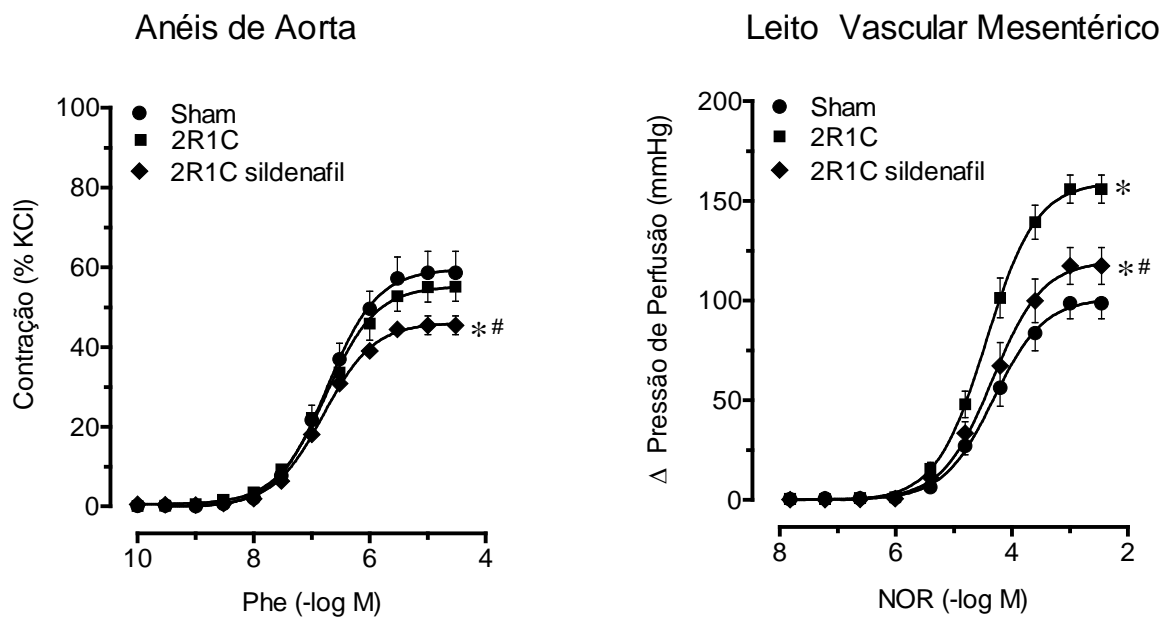


Figura 15: Efeitos do sildenafil na vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico e por Phe em anéis de aorta no modelo de hipertensão renovascular 2R1C comparados com camundongos 2R1C não tratados e Sham. Valores expressos como média \pm EPM. n= 6-8. # $p < 0,05$ vs 2R1C e * $p < 0,05$ vs Sham

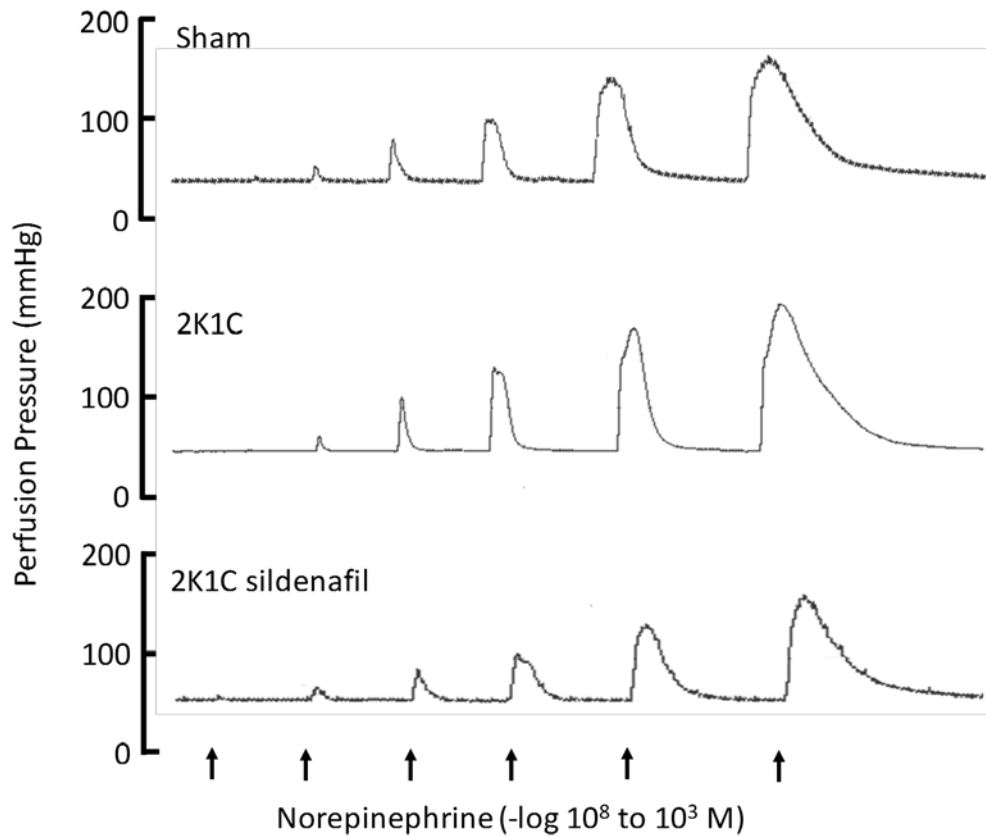


Figura 16: Representação típica de registros de Curvas dose-respostas no LVM nos diferentes grupos experimentais.

4.3.2 Participação do endotélio na reatividade do LVM

A figura 17 e a tabela 2 mostram a participação do endotélio na contração do LVM frente a doses crescentes de NOR. O papel do endotélio vascular foi avaliado por meio do ΔAUC das curvas de contração à NOR antes e depois da remoção do endotélio vascular do LVM.

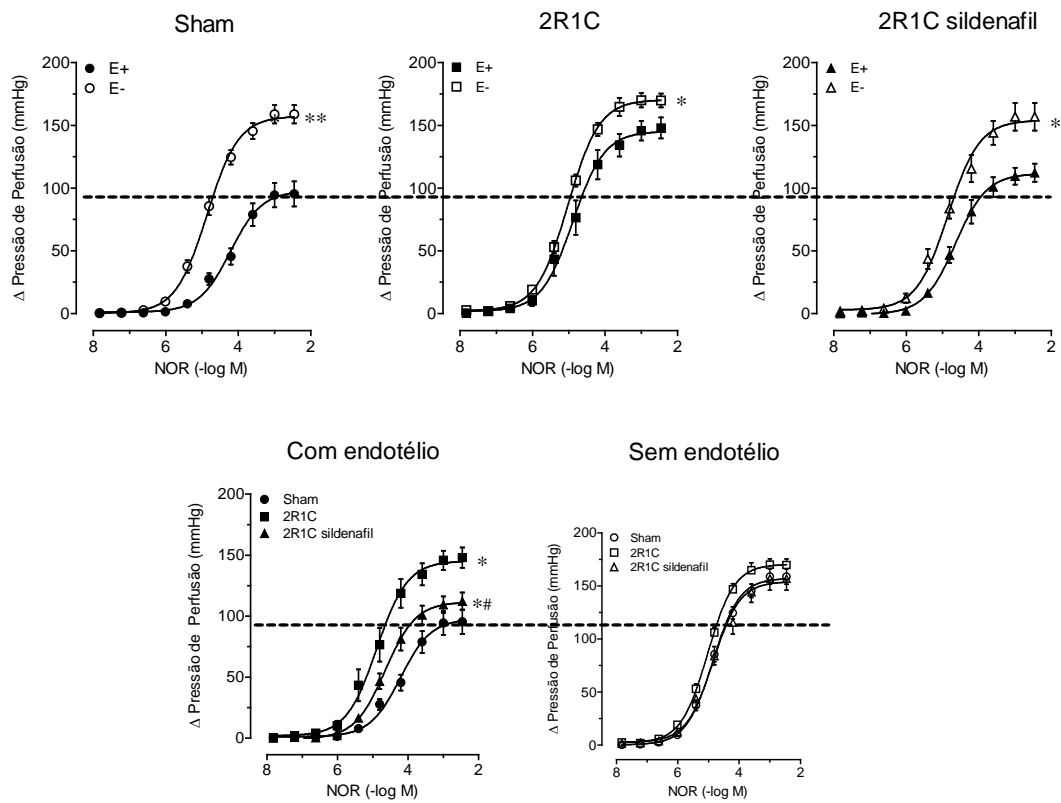


Figura 17: Efeito do sildenafil na vasoconstrição induzida por NOR no leito vascular mesentérico em camundongos hipertensos 2R1C comparados com camundongos 2R1C não tratados e Sham sob condição normal (E+) e após remoção do endotélio (E-). A linha pontilhada se refere à resposta máxima do grupo Sham sob condição normal. Valores expressos como média \pm EPM. $n = 6-8$ animais por grupo. * $p < 0,05$ vs Sham e # $p < 0,05$ vs 2R1Csildenafil (ANOVA de duas vias para medidas repetidas).

Observou-se uma participação menor do endotélio na contração dos animais do grupo 2R1C (86 ± 7) quando comparados com os animais do grupo SHAM (201 ± 27). Participação que foi parcialmente restaurada nos animais do grupo 2R1C Sildenafil (134 ± 13) quando comparados ao grupo SHAM e 2R1C.

Tabela 2. Efeitos do sildenafil sobre os parâmetros da curva dose-resposta à NOR sob condições basais e a contribuição do endotélio (remoção) e bloqueio da NADPH oxidase (apocinina) na disfunção endotelial em camundongos Sham, 2R1C e 2R1C tratados com sildenafil.

Parâmetros da Curva	Sham	2R1C	2R1C sildenafil
R_{max} (%)			
Norepinefrina	118±12	162±14**	116±9##
Norepinefrina sem endotélio	157±13 ^a	170±14	154±11**
Norepinefrina após Apocinina	120±11	115±3.21 ^a	108±8
pEC₅₀ (-log M)			
Norepinefrina	4.5±0.1	4.9±0.5	4.5±0.3
Norepinefrina sem endotélio	4.9±0.2 ^a	5.0±0.2	4.8±0.4
Norepinefrina após Apocinina	4.6±0.2	5.0±0.4	4.5±0.5
Δ Área abaixo da curva (unidades arbitrárias)			
Remoção do endotélio	201±27	86±7**	134±13***
Norepinefrina e Apocinina	15±6	101±16**	4±2##

R_{max}, resposta máxima (eficácia). pEC₅₀, logaritmo negativo da concentração capaz de produzir 50% do R_{max} (sensibilidade). Valores expressos em média ± EPM para 8-12 animais por grupo. **p<0.01 vs. Grupo Sham ; ##p<0.01 vs. 2R1C; ^ap<0.05 e ^{aa}p<0.01 vs.respectivo controle (Anova).

4.3.3 Participação das EROs na reatividade do LVM

A figura 18 e a tabela 2 mostram a participação das EROs na contração do LVM frente a doses crescentes de NOR. O papel das EROs foi avaliado por meio do ΔAUC das curvas de contração à NOR antes e depois da adição do inibidor apocinina que promove a inibição da enzima NADPH oxidase, principal geradora de EROs nas células endoteliais.

mHg)

Figura 18: Figura 19: Efeitos do sildenafil na vasoconstricção induzida por NOR no LVM em animais com hipertensão 2R1C comparados aos camundongos 2R1C não tratados e Sham sob condição normal (controle) e após o bloqueio da NADPH oxidase com apocinina. Linha tracejada se refere à resposta máxima do grupo Sham sob condição normal. Valores expressos como média \pm EPM para n= 6-8 animais por grupo. *p<0.05 vs. Sham e #p<0.05 vs. 2R1C sildenafil (ANOVA duas vias para medidas repetidas)

Observou-se uma grande participação das EROs na hiper-reatividade apresentada pelos animais do grupo 2R1C quando comparados aos animais do grupo SHAM (101 ± 16 vs 15 ± 6 , respectivamente). Esta participação foi abolida nos animais do grupo 2R1Csildenafil (4 ± 2).

4.4 Dosagem das angiotensinas plasmáticas

A figura 19 apresenta os gráficos referentes à dosagem de angiotensina I (fig. 19 A), angiotensina II (fig19 B) e angiotensina 1-7 (fig 19 C).

Observou-se que os níveis de AngI plasmática nos grupos 2R1C e 2R1Csildenafil ($99 \pm 8,6$; $95 \pm 6,7$, respectivamente) não estavam alteradas em relação ao grupo SHAM (100). (Fig. 19 A)

A figura 19B demonstra que os níveis de AngII plasmática está levemente elevada nos animais do grupo 2R1C ($114 \pm 7,7$) em relação ao grupo SHAM (100), porém essa diferença não é estatisticamente significativa. Já os animais do grupo 2R1C sildenafil não apresentaram alteração nos níveis de AngII, quando comparados ao grupo SHAM. Esta figura também demonstra que há uma leve redução nos níveis de AngII nos animais 2R1C sildenafil em relação aos animais 2R1C, entretanto esta diferença não é estatisticamente significativa.

A figura 19C demonstra que os níveis de Ang1-7 dos animais do grupo 2R1C não estão alterados em relação ao grupo SHAM ($102 \pm 10,4$ vs 100, respectivamente). Já os níveis de Ang1-7 dos animais do grupo 2R1Csildenafil estão aumentados ($146 \pm 13,3$) em relação ao grupo SHAM e ao grupo 2R1C.

Figura 19: Efeito do sildenafil na angiotensina I, II e 1-7 plasmática no modelo animal de hipertensão renovascular 2R1C comparado com camundongos 2R1C não tratados e Sham. Valores expressos como média \pm EPM. n= 6 por grupo. *p<0.05 and **p<0.01 (ANOVA uma via)

4.5 Avaliação da peroxidação lipídica

A figura 20 apresenta o gráfico com as medidas das TBARS (nmol MDA/ grama de tecido) avaliadas a partir de amostrar do LVM. Os animais do grupo 2R1C apresentam elevada peroxidação lipídica quando comparados com o grupo SHAM ($101,5 \pm 9,1$ vs $63,7 \pm 7,0$, respectivamente). O tratamento com sildenafil restaurou esse aumento de peroxidação lipídica aos níveis basais (2R1Csildenafil: $64,42 \pm 12,49$ vs Sham: $63,7 \pm 7,0$).

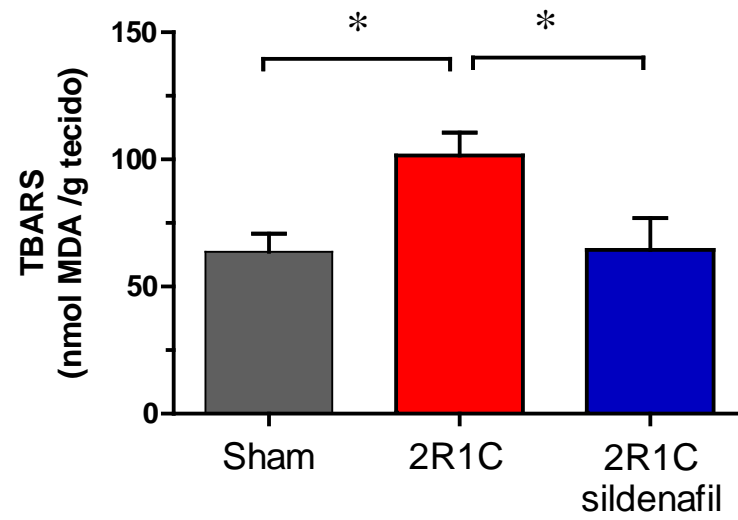


Figura 20: Efeito do sildenafil no estresse oxidativo arteriolar, avaliado por ensaio de peroxidação lipídica das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbutúrico (TBARS), em camundongos hipertensos 2R1C comparados com camundongos não tratados e camundongo Sham. Valores expressos como média \pm EPM. N = 6

Discussão

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, os principais resultados obtidos demonstram que o tratamento dos camundongos com hipertensão renovascular 2R1C com o inibidor da enzima fosfodiesterase 5, sildenafil, foi capaz de reduzir a FC e PAM que se mostrou elevada nestes animais. O sildenafil foi capaz também de restaurar a hiperreatividade à NOR presente nas artérias de resistência no modelo 2R1C, aumentar a produção da fração de Ang 1-7 tanto em relação aos camundongos com hipertensão arterial instalada quanto em relação aos animais do grupo sham, além de diminuir a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) o que reflete em uma diminuição da peroxidação lipídica, resultante do aumento do estresse oxidativo.

Em nosso estudo, os animais 2R1C apresentam redução no peso corporal ao final do período experimental, resultado que está de acordo com outros trabalhos já realizados em nosso laboratório (DIAS *et al.*, 2014, CAMPAGNARO, *et al.*, 2013, NOGUEIRA *et al.*, 2012). Entretanto, observamos que os animais 2R1C que foram submetidos ao tratamento com sildenafil não apresentaram essa perda de peso característica do modelo de hipertensão em relação aos animais do grupo sham.

A hipertensão renovascular é a forma mais comum de hipertensão secundária. Experimentalmente, Goldblatt e colaboradores na década de 30, desenvolveram o modelo de hipertensão renovascular 2R1C em cães. O modelo consiste em causar isquemia parcial em um dos rins através da implantação de um clipe inerte na artéria renal do animal. Posteriormente, Miksche e colaboradores, na década de 70 reproduziram o modelo em ratos e Wiesel e colaboradores, já na década de 90 estabeleceram o modelo 2R1C em camundongos (WEISEL *et al.*, 1997).

No estudo realizado por Weisel e colaboradores (1997), ficou estabelecido que a abertura do clipe implantado na artéria renal, é essencial para o desenvolvimento da hipertensão. Os pesquisadores demonstraram que camundongos com o peso aproximado de 23g, necessitam de um clipe com 0,12mm de abertura para que com duas semanas, após a implantação do clipe, os níveis de pressão arterial estejam aproximadamente 20mmHg maiores quando comparados com os animais controle e com quatro semanas níveis aumentados em aproximadamente 35mmHg. O clipe com 0,11mm induziu alto percentual de infarto renal, e o clipe com 0,13mm de abertura não produz hipertensão nos camundongos (WEISEL *et al.*, 1997). Em nosso laboratório o modelo 2R1C vem sendo estudado com sucesso em camundongos da

linhagem C57BL/6 (DIAS *et al.*, 2014; CAMPAGNARO, *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2012; GAVA *et al.*, 2008; PEOTTA *et al.*, 2007; ARRUDA *et al.*, 2005).

Uma característica comum, no modelo de hipertensão 2R1C, são alterações na estrutura renal, pois a estenose realizada por meio da implantação do clipe é capaz de promover atrofia do rim clipado e por mecanismo compensatório o rim não clipado sofre hipertrofia (LORENZ *et al.*, 2011; MATAVELLI *et al.*, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2012; CHENG *et al.*, 2009). Em nosso estudo realizou-se a análise da razão entre os pesos do rim esquerdo (clipado)/rim direito (não clipado) e demonstrou-se por meio desta razão que nos animais submetidos à hipertensão por estenose do rim esquerdo apresentaram uma diminuição da massa do rim clipado e um aumento do rim não clipado. Entretanto, os animais que foram submetidos ao tratamento com sildenafil esta razão esteve mais próxima à razão do grupo SHAM demonstrando que a diferença de atrofia do rim esquerdo e hipertrofia do rim direito foi atenuada.

É bem estabelecido que o desenvolvimento e manutenção da hipertensão no modelo 2R1C está intimamente ligado ao aumento da atividade do SRA por meio do aumento da liberação de renina pelo rim isquêmico (HIYOSHI *et al.*, 2005). O SRA é o mais conhecido regulador de pressão do organismo. Ele controla o fluido e balanço eletrolítico através de efeitos coordenados no coração, vasos sanguíneos e rins. A AngII é o principal peptídeo efetor do SRA atuando no coração e nos rins por ligação a receptores acoplados a proteína-G dos tipos 1 e 2 (AT₁ e AT₂). Os receptores do tipo AT₁ medeiam os efeitos deletérios da AngII como por exemplo o aumento da resistência periférica que faz com que a pressão arterial se eleve (REMUZZI *et al.*, 2005). O aumento da frequência cardíaca é também um efeito clássico da hipertensão 2R1C, causada pelo aumento nos níveis de AngII, tanto em ratos como em camundongos (JUST *et al.*, 2000). A AngII circulante atua em diferentes áreas do sistema nervoso central, determinando um aumento no tônus simpático cardíaco (NAVAR *et al.*, 1998). De fato, em nosso estudo, os camundongos 2R1C apresentaram a PAM 21,5% e FC 16,6% maior que os animais do grupo SHAM. Interessantemente, o tratamento com sildenafil foi capaz de diminuir em 10,3% a PAM e 8,4% a FC, sugerindo que o sildenafil possa ser um promissor anti-hipertensivo. Alguns estudos já vêm demonstrando que a inibição do PDE5 pode ser uma opção para a redução da pressão, em alguns casos de hipertensão (GHIADONI L, VERSARI D, TADDEI S 2008). Em outros estudos realizados em ratos com hipertensão induzida

por L-NAME (FERREIRA-MELO *et al.*, 2006) e ratos SHR (YAGUAS K, *et al.*, 2010) o sildenafil se mostrou capaz de também reduzir a pressão arterial.

Um possível mecanismo para a redução da PAM é a diminuição dos níveis de Ang II que está aumentada no modelo 2R1C (XIE *et al.*, 2006). Estudos recentes em nosso laboratório (DIAS *et al.*, 2014) demonstraram redução nos níveis de Ang II em tecido renal, após o tratamento dos animais 2R1C com sildenafil. Neste presente estudo não foi observado aumento significativo nos níveis de Ang II plasmático, apesar de ter sido observado uma tendência ao aumento. O tratamento com sildenafil normalizou o aumento observado. Acredita-se que a diferença no nível plasmático está mais evidente com 14 dias após a cirurgia 2R1C pois nessa fase ocorre o pico máximo de produção de Ang II como foi demonstrado em outros trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório (CAMPAGNARO 2012; NOGUEIRA 2008).

Este estudo tem como pioneirismo, o fato de demonstrar um aumento na produção da fração de Ang-(1-7) nos animais com hipertensão 2R1C que foram submetidos ao tratamento com sildenafil. A Ang-(1-7) foi descrita pela primeira vez em 1988 por Santos e colaboradores e a partir de então uma série de estudos foram realizados para entender o mecanismo de ação deste peptídeo. Atualmente, aceita-se que a Ang-(1-7) exerce várias funções, muitas delas opostas à função atribuída ao principal peptídeo efetor do SRA, Ang II (SANTOS *et al.*, 2013). Estudos recentes demonstram que a fração Ang-(1-7) foi capaz de aumentar os níveis de eNOS e diminuir a produção de aniões superóxidos em camundongos apoE *knockout* (TESANOVIC *et al.*, 2010). Ratos Ren-2 Transgênicos (TGR), modelo monogênico de hipertensão, após duas semanas de hipóxia experimental, apresentaram supressão do eixo ECA→Ang II sistêmico e renal e aumento na expressão do eixo ECA2→Ang-(1-7), sendo este mecanismo responsável pelos efeitos que culminaram na diminuição da PA no modelo TGR (ČERVENKA *et al.*, 2014). Uma possível explicação para o fato de o grupo 2R1C tratado com sildenafil ter apresentado redução na PAM e FC pode, desse modo, estar associado ao aumento dos níveis de Ang-(1-7) encontrados em nosso estudo.

A hipertensão arterial tem como consequência a hipertrofia cardíaca. Ela é resultante de uma adaptação miocárdica consequente de um aumento da sobrecarga mecânica imposta ao coração, podendo estar associada aos fatores fisiopatológicos, hormonais ou genéticos, que culminam no espessamento da massa ventricular

(MACIEL, 2001). O modelo 2R1C é caracterizado pelo aumento dos níveis de Ang II circulante que ao se ligarem aos receptores AT₁ promovem os efeitos deletérios da hipertensão, como vasoconstrição e hipertrofias cardíaca e de vasos (REMUZZI *et al.*, 2005). Diversos estudos sobre modelos de hipertensão, demonstram a hipertrofia cardíaca como condição *sine qua non* da hipertensão arterial. Estudo realizado com ratos Sprague-Dawley com hipertensão 2R1C demonstrou a presença de hipertrofia cardíaca após 10 semanas de implantação do clipe na artéria renal (AMAT *et al.*, 2014). Em outro estudo utilizou-se camundongos C57 nos quais foram implantadas bombas de infusão osmótica de Ang II e, após 3 semanas, estes animais agora hipertensos também apresentaram hipertrofia cardíaca (WESTERMANN *et al.*, 2012) e camundongos C57 2R1C após 5 semanas de implantação do clipe também apresentaram hipertrofia cardíaca (CHENG *et al.*, 2009). Estes e outros estudos levaram em consideração a relação entre o peso do ventrículo esquerdo ou coração e o peso corporal total para avaliar a incidência de hipertrofia cardíaca. Entretanto, o estudo de Yin e colaboradores em 1982, demonstrou que flutuações no peso corporal que ocorrem em relação à idade ou doença, como ocorre em animais hipertensos assim como em nosso estudo, podem mascarar a presença de hipertrofia cardíaca. Este estudo demonstrou que, para esses casos, é mais apropriado para evidenciar a presença de hipertrofia cardíaca a razão do peso do coração (ou ventrículo esquerdo) pelo comprimento da tíbia. Desse modo, em nosso estudo, não foi observada hipertrofia cardíaca nos animais submetidos à hipertensão 2R1C.

O SRA foi inicialmente considerado como um sistema de circulação humoral, com funções na regulação da pressão sanguínea e na homeostase do sódio e água. Sabe-se agora, que adicionalmente ao SRA humoral “clássico” muitos tecidos têm um SRA local (tecidual ou parácrino) que contém os diferentes conteúdos descritos para o SRA circulatório. Embora ambos (SRA circulatório e local) atuem juntos em diferentes tecidos, está sendo aceito que os componentes circulatórios são muito menos importantes que a formação local de angiotensinas para o funcionamento do sistema (LABANDEIRA-GARCIA, *et al.*, 2014). Níveis de AngII aumentados de maneira anormal, induzem o estresse oxidativo e exacerbam a inflamação (SKOV, *et al.*, 2014). Ang II é o maior ativador do complexo da NADPH oxidase o qual é a mais importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) excetuando a mitocôndria. Sabe-se que as oxidases dependentes da NADPH são reguladas positivamente nas

principais doenças relacionadas com envelhecimento como hipertensão, diabetes e aterosclerose. (LANBADEIRA-GARCIA, *et al.*, 2014) bem como em doenças isquêmicas renais (LEGRAND, *et al.*, 2008; UTTARA, *et al.*, 2009).

A produção aumentada de AngII no modelo 2R1C ativa a NADPH oxidase (GUIMARÃES, *et al.*, 2013). A NADPH oxidase melhor caracterizada é a fagocítica, presente em macrófagos e neutrófilos, sendo um complexo proteico multimérico com componentes na membrana celular e citoplasma. A NADPH oxidase expressa nas células vasculares difere daquela encontrada nos fagócitos, tanto pela estrutura bioquímica quanto pelas funções, resultando na formação da família NOX (*Nonphagocytic NADPH Oxidase*). Os principais componentes do complexo enzimático, Nox1 e Nox4, são altamente expressos nas células vasculares e aumentados durante o processo de remodelamento vascular, como hipertensão e aterosclerose (RABÊLO LA, *et al.*, 2010; ROMERO M, *et al.*, 2009). O mecanismo envolvido na produção de EROs induzidas por AngII é bem caracterizada. A produção das EROs pode ser dividida em uma fase aguda, envolvendo uma proteína Kinase C (PKC), c-Src, receptores do fator de crescimento de transativação e translocação da subunidade p47^{phox} citosólica para a membrana, e uma fase sustentada envolvendo uma regulação positiva das subunidades da NADPH oxidase a qual também envolve ativação da PKC (ROMERO M, *et al.*, 2009). Estes fenômenos levam ao aumento do estresse oxidativo, estado no qual há um desbalanço na produção de EROs que supera o sistema antioxidante endógeno. Estudos em cultura de células do músculo liso vascular e artérias isoladas de ratos hipertensos, mostram que a produção de EROs está aumentada e a capacidade antioxidante está reduzida (CUZZOCREA, *et al.*, 2004). Diminuição da catalase e/ou superóxido dismutase e redução dos níveis de 'sequestradores' de EROs como a glutatona e as vitaminas C e E que fazem parte do sistema antioxidante endógeno e exógeno podem contribuir para o estresse oxidativo (BARADARAN A, *et al.*, 2014). As EROs produzidas reagem rapidamente com o NO, aumentando a formação de peroxinitrito, diminuindo sua biodisponibilidade. Esse estresse oxidativo aumentado no modelo animal de hipertensão é evidenciado por níveis significativamente mais altos de TBARS no plasma de animais 2R1C quando comparados com ratos normotensos, refletindo aumento na peroxidação lipídica, uma consequência do aumento do estresse oxidativo (OLIVEIRA-SALES EB, *et al.*, 2008; GARCÍA-SAURA MF, *et al.*,

2005). Estudo realizado em coelhos hipercolesterolêmicos demonstrou que o sildenafil apresenta a capacidade de suprimir a atividade da NADPH oxidase que se encontra aumentada neste modelo (SHUKLA *et al.*, 2005). Os nossos resultados corroboram com os dados encontrados na literatura que demonstram um aumento nos níveis de TBARS nos animais com hipertensão 2R1C quando comparados com os animais do grupo SHAM. Esse aumento foi restaurado quando os animais 2R1C foram tratados com sildenafil, como pode ser observado na figura 21.

Um dos mecanismos que está associado à hipertensão arterial está no fato de a Ang II promover um *upregulation* nas PDEs 1 e 5, além de ativar a NADPH oxidase (GUIMARÃES *et al.*, 2013; GIACHINI *et al.*, 2011). Assim, além da ação direta da Ang II se ligando aos receptores AT₁, ocasionando a vasoconstrição periférica que leva ao quadro de hipertensão, o aumento na atividade das PDEs faz com que a biodisponibilidade do NO diminua, além da produção exacerbada de ânions superóxidos que reagem com o NO para, também, diminuir sua biodisponibilidade e assim colaborando com o aumento da contratilidade dos vasos. O pioneiro estudo de Finch, em 1971, demonstrou a presença de hiper-reatividade em mesentérios isolados de ratos em um modelo de hipertensão renal. Outro estudo realizado em ratos machos Wistar Kyoto com hipertensão 2R1C, demonstrou-se a presença de hiper-reatividade no leito mesentérico frente à NOR após 12 semanas de implantação do clipe na artéria renal destes animais (DOHI *et al.*, 1991). Em estudo realizado por Schäfer e colaboradores, em 2012, demonstrou-se, entre outros resultados, que no modelo 2R1C a disfunção endotelial está presente somente nos vasos de resistência (SCHÄFER, *et al.*, 2012). Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram que camundongos C57 submetidos à hipertensão 2R1C apresentaram hiper-reatividade no frente à NOR quando comparados com animais controles (ARRUDA *et al.*, 2005) e disfunção endotelial nos vasos de resistência de animais com hipertensão 2R1C (DIAS *et al.*, 2014). Nosso estudo demonstrou que este mesmo modelo apresenta hiper-reatividade à NOR nos vasos de resistência, mas tal hiper-reatividade não ocorreu nos vasos de condutância, confirmando o estudo de Schäfer e colaboradores. Nosso estudo revelou ineditismo ao demonstrar que animais submetidos à hipertensão 2R1C tratados com sildenafil apresentaram redução da hiper-reatividade frente à NOR quando comparados aos animais 2R1C.

É bem estabelecido que o endotélio é um importante regulador do tônus dos vasos sanguíneos por meio da liberação de diversas substâncias endógenas. Tem sido reportado que as células endoteliais liberam fatores derivados do endotélio, como fatores relaxantes (EDRFs; NO e PGI_2) e fatores contráteis (EDCFs; Endotelina, $PGF_{2\alpha}$ e tramboxano A_2). É largamente reconhecido que a disfunção do endotélio bem como sua remoção resulta no aumento da resposta contrátil pelo desequilíbrio na liberação das substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras (IWATANI *et al.*, 2008). A hipertensão, aterosclerose e o diabetes são doenças associadas à disfunção vascular (GRIENGLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000; LIU *et al.*, 2013). Em 1991, Dohi e colaboradores demonstraram que ratos wistar com hipertensão renovascular 2R1C apresentaram alteração no relaxamento vascular de vasos de resistência e o endotélio vascular destes animais influenciavam nessa alteração (DOHI *et al.*, 1991). Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram que em animais hipercolesterolêmicos (BALARINI *et al.*, 2013) e com hipertensão renovascular 2R1C (DIAS *et al.*, 2014) o tratamento com sildenafil foi capaz de restaurar a função endotelial restabelecendo o relaxamento frente à droga vasodilatadora acetilcolina. Em um estudo realizado com a prole de ratas wistar com diabetes experimental, demonstrou que após seis meses de vida já se estabelece o quadro de hiperreatividade com marcante prejuízo na função endotelial, tendo este quadro acentuado drasticamente após 12 meses de nascimento (RAMOS-ALVES *et al.*, 2012). Neste estudo a manobra de remover o endotélio e comparar a diferença das áreas abaixo das curvas dos gráficos de contração à NOR, nos revela a participação do endotélio na contratilidade dos vasos do LVM. Os resultados obtidos neste presente estudo demonstraram com primazia que animais com hipertensão renovascular 2R1C possuem a função endotelial dos vasos de resistência prejudicada, o que acarreta um quadro de hiperreatividade frente à droga vasoconstrictora, e que o tratamento com sildenafil foi capaz de restabelecer a função endotelial melhorando a função vascular destes animais.

Como mencionado anteriormente, o endotélio possui a capacidade de liberar substâncias que atuam na regulação do tônus dos vasos sanguíneos, e a disfunção endotelial pode ser definida como um desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de EDRFs e EDCFs, associados com o aumento da biodisponibilidade das EROs e diminuição da capacidade antioxidante caracterizada

como estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2012). Em revisão recente, Silva e colaboradores em 2012, evidenciaram que nos mais variados modelos de hipertensão utilizados em pesquisas o estresse oxidativo é característica presente. Outro estudo define estresse oxidativo como um estado no qual o excesso de EROs supera o sistema antioxidante endógeno e que esta condição contribui na hipertensão renovascular (OLIVEIRA-SALES *et al.*, 2008). Rodrigues e colaboradores, em 2008, demonstrou que a vitamina C diminuiu a marcante presença das EROs em ratos com hipertensão 2R1C (RODRIGUES *et al.*, 2008). No presente estudo, ao usarmos o bloqueador de NADPH oxidase, apocinina, pode-se comparar a participação das EROs na contratilidade dos grupos experimentais e observou-se que nos animais com hipertensão 2R1C há uma exacerbação na produção de EROs, o que prejudicou a contratilidade do LVM quando comparados aos animais do grupo SHAM. Curiosamente, o tratamento com sildenafil diminuiu a participação das EROs nos animais hipertensos, de modo que a contratilidade foi restaurada quando comparada ao grupo SHAM. Um estudo recente, sugere uma possível ação antioxidante do sildenafil atuando em ratos wistar com hipertensão 2R1C. (GUIMARÃES *et al.*, 2013). Levanta-se então a questão de que o sildenafil poderia também exercer a função de antioxidante neste modelo de hipertensão. Além destes resultados encontrados em nosso trabalho, um estudo recente demonstrou a presença de receptores de Ang-(1-7) no LVM, sugerindo que os níveis aumentados dessa fração nos animais tratados com sildenafil também possa influenciar na melhora da função vascular (NEVES *et al.*, 2002).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Demonstrou-se, com este trabalho, que o tratamento crônico com sildenafil exercer efeitos benéficos na hipertensão renovascular. Este estudo demonstrou que o sildenafil foi capaz de reduzir a PAM e FC, diminuir a perda de peso apresentada pelos animais 2R1C, além da tendência de diminuir os níveis os níveis plasmáticos de AngII, Também foi capaz de aumentar a produção da fração de Ang-(1-7).

Os camundongos 2R1C tratados com sildenafil, apresentaram também, uma diminuição na produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), demonstrando uma melhora no estresse oxidativo.

Esta melhora se reflete na função vascular dos animais tratados com sildenafil, que além da diminuição na produção de EROS também demonstrou melhora na função endotelial do LVM restaurando a hiper-reatividade apresentada na hipertensão renovascular.

Este estudo confirma que o sildenafil é uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento da hipertensão renovascular em pacientes de alto risco. Entretanto outras pesquisas de cunho básico e clínico são ainda necessárias para confirmar esta possível abordagem farmacológica.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- Arruda R.M.P. et al. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension*, v. 46, p. 932-936, Oct, 2005.
- Amat N, Amat R, Abdureyim S, Hoxur P, Osman Z, Mamut D, Kijjoa A. Aqueous extract of *dioscorea opposita thunb.* normalizes the hypertension in 2K1C hypertensive rats. *BMC Complement Altern Med.* 2014 Jan 21;14:36
- Ambühl P, Felix D, Khosla MC. [7-D-ALA]-angiotensin-(1-7): selective antagonism of angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res Bull.* 1994;35(4):289-91.
- Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Fabbri A, Spera G, Fini M, Rosano GM. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2008 Jan;25(1):37-44.
- Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci.* 2014 Apr;19(4):358-67. Review.
- Balarini CM, Leal MA, Gomes IB, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med.* 2013 Jan 5;11:3
- Bivalacqua TJ, Sussan TE, Gebska MA, Strong TD, Berkowitz DE, Biswal S, Burnett AL, Champion HC. Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of secondhand smoke induced erectile dysfunction. *The Journal of Urology.* 2009;181(2):899–906.
- Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins.* 1976 Dec;12(6):897-913
- Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int.* 2014;2014:598271.
- CAMPAGNARO BP. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células hematopoiéticas e endoteliais de camundongos. Tese de Doutorado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2012.
- CAMPAGNARO B.P, et al. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. *DNA Cell Biol*, v. 32, n.8, p. 458-466, 2013.
- Cohn JN, Tognoni G. A randomized of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345(23):1667-1675.

Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*. 1998 Jan;31(1 Pt 2):362-7.

Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RA, Khosla MC, Brosnihan KB, Ferrario CM. Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol*. 1989 Jul;257(1 Pt 2):H324-9.

Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol*. 1992 Jul;263(1 Pt 2):R89-94.

Cheng J, Zhou W, Warner GM, et al. Temporal analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney, one-clip hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(4):F1055-F1068.

Cervenka L, Bíbová J, Husková Z, Vaňourková Z, Kramer HJ, Herget J, Jíchová S, Sadowski J, Hampl V. Combined suppression of the intrarenal and circulating vasoconstrictor renin-ACE-ANG II axis and augmentation of the vasodilator ACE2-ANG 1-7-Mas axis attenuates the systemic hypertension in Ren-2 transgenic rats exposed to chronic hypoxia. *Physiol Res*. 2014 Sep 5.

CUZZOCREA S, MAZZON E, DUGO L, DI PAOLA R, CAPUTI AP, SALVEMINI D. Superoxide: a key player in hypertension. *Faseb J* 18:94-101; 2004.

Dohi Y, Criscione L, Lüscher TF. Renovascular hypertension impairs formation of endothelium-derived relaxing factors and sensitivity to endothelin-1 in resistance arteries. *Br J Pharmacol*. 1991 Oct;104(2):349-54.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9.

Drapala A, Sikora M, Ufnal M. Statins, the renin-angiotensin-aldosterone system and hypertension - a tale of another beneficial effect of statins. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2014 Jul 18.

Dias AT, Cintra AS, Frossard JC, Palomino Z, Casarini DE, Gomes I, Balarini CM, Gava AL, Campagnaro BP, Pereira T, Meyrelles SS, Vasquez EC. Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *J Transl Med*. 2014 Sep 16;12(1):250.

Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci*. 2011 Sep;36(4):731-7.

Ferreira-Melo SE, Yugar-Toledo JC, Coelho OR, De Luca IM, Tanus-Santos JE, Hyslop S, Irigoyen MC, Moreno H Jr. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. *Eur J Pharmacol*. 2006 Aug 7;542(1-3):141-7

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.

Ferrario CM, Martell N, Yunis C, Flack JM, Chappell MC, Brosnihan KB, Dean RH, Fernandez A, Novikov SV, Pinillas C, Luque M. Characterization of angiotensin-(1-7) in the urine of normal and essential hypertensive subjects. *Am J Hypertens*. 1998 Feb;11(2):137-46.

Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease: therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006; 7:3-14.

Field LJ, Gross KW. Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Sep;82(18):6196-200.

Glossmann H, Petrischor H, Bartsch G. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil. *Experimental Gerontology*. 1999;34(3):305–318.

Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS (2008). Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 86(7): 458-464.

Ghiadoni L, Versari D, Taddei S. Phosphodiesterase 5 inhibition in essential hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2008 Feb;10(1):52-7.

Guimarães D a, Rizzi E, Ceron CS, Pinheiro LC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biol [Internet]*. Elsevier; 2013 Jan (1):578–85.

García-Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A, Zarzuelo A, Vargas F, Duarte J. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2005 Feb;270(1-2):147-55.

Giachini FR, Lima VV, Carneiro FS, Tostes RC, Webb RC. Decreased cGMP level contributes to increased contraction in arteries from hypertensive rats: role of phosphodiesterase 1. *Hypertension*. 2011 Mar;57(3):655-63.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):494-501. Review.

Hiyoshi H, Katsutoshi Y, Masaoki T, et al. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* 2005; 45:967-973.

Halcox JPJ, Nour KRA, Zalos G, Mincemoyer R, Waclawiw MA, Rivera CE, Willie G, Ellahham S, Quyyumi AA. The effect of sildenafil on human vascular function, platelet activation, and myocardial ischemia. *Journal of the American College of cardiology*. 2002;40(7):1232–1240.

Heeneman S, Smits JF, Leenders PJ, et al. Effects of angiotensin II on cardiac function and peripheral vascular structure during compensated heart failure in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(10):1985-1994.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K: Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *New Engl J Med* 346: 1954–1962, 2002

Iwatani Y, Kosugi K, Isobe-Oku S, Atagi S, Kitamura Y, Kawasaki H. Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. *Br J Pharmacol*. 2008 May;154(1):32-40.

Just A, Faulhaber J, Ehmke H. Autonomic cardiovascular control in conscious mice. *Am J Physiol Regul Integrative Comp Physiol*, 2000 279: R2214-R2221.

Khangura KK, Eirin A, Kane GC, Misra S, Textor SC, Lerman A, Lerman LO. Cardiac function in renovascular hypertensive patients with and without renal dysfunction. *Am J Hypertens*. 2014 Mar;27(3):445-53.

Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, Nishizawa Y. Molecular Pathways of Cyclic Nucleotide-Induced Inhibition of Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation. *Journal of Cellular Physiology*. 2001;186(1):1–10.

Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007 Sep;59(3):251-87.

Kuppasani K, Reddi AS. Emergency or urgency? Effective management of hypertensive crises. *JAAPA* 2010; 23:44-49.

Lewandowski J. [Renovascular hypertension: is it only the top of the iceberg?]. *Pol Merkur Lekarski*. 2003 Oct;15(88):371-5; discussion 375-6.

Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, Krier JD, Schwartz RS, Napoli C, Romero JC: Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension* 37: 541–546, 2001.

Lorenz JN, Lasko VM, Nieman ML, Damhoff T, Prasad V, Beierwaltes WH, Lingrel JB. Renovascular hypertension using a modified two-kidney, one-clip approach in mice is not dependent on the α 1 or α 2 Na-K-ATPase ouabain-binding site. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011 Sep;301(3):F615-21.

Labandeira-García JL, Garrido-Gil P, Rodriguez-Pallares J, Valenzuela R, Borrajo A, Rodriguez-Perez AI. Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability. *Front Neuroanat*. 2014 Jul 8;8:67.

Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med*. 2008 Jul-Aug;14(7-8):502-16. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009., v. 7, n.1, p. 65-74.

MACIEL BC, A hipertrofia cardíaca na hipertensão arterial sistêmica: mecanismo compensatório e desencadeante de insuficiência cardíaca. *Rev Bras Hipertens*. 2001 Dez; 8:409-13.

Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin AT₂ receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension*. 2011 Feb;57(2):308-13..

Milani E, Nikfar S, Khorasani R, Zamani MJ, Abdollahi M. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2005;140(2):251–255.

Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Degan M, Menapace L, Tommasoli R, Seta F, Capone ML, Tacconelli S, Palatresi S, Bencini C, Del Vecchio C, Mansueto G, Arosio E, Santonastaso CL, Lechi A, Morganti A, Patrono C: Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation* 106: 2800–2805, 2002

MONTEZANO A.C., TOUYZ R.M. Molecular mechanisms of hypertension-reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol*, v. 28, n. 3, p. 288-295, May, 2012.

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. *Lipids Health Dis*. 2011 Nov 14;10:211.

Morimoto S, Cassel MD, Sigmund CD. The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene. *Circ Res* 2002; 90(1):80-86.

May AG, Van de Berg L, Dewese JA, et al. Critical arterial stenosis. *Surgery*. 1963; 54:250–259.

NOGUEIRA B.V. et al. Cellular Physiology and Biochemistry Granulocyte Colony Stimulating Factor Prevents Kidney Infarction and attenuates Renovascular Hypertension. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 29, p. 143-152, 2012.

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H (2002). Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*, 39: 316-322.

NOGUEIRA, BRENO VALENTIM. Efeitos do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) sobre a hipertensão renovascular em camundongos. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2008.

NAVAR L.G. et al. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol Sci*, v. 13, p. 170-176, Aug,1998.

Neves LA, Averill DB, Ferrario CM, Chappell MC, Aschner JL, Walkup MP, Brosnihan KB. Characterization of angiotensin-(1-7) receptor subtype in mesenteric arteries. *Peptides*. 2003 Mar;24(3):455-62.

Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, Abreu NP, Boim MA, Martins PJ, D'Almeida V, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2008 Jan;21(1):98-104.

Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, Roman M, Ramirez C, Copaja M, Diaz-Araya G, Castro P, Lavandero S. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension*. 2006 Oct;48(4):572-8.

Ozsarlak O, Parizel PM. Role of mr angiography in the evaluation of renovascular hypertension. *JBR-BTR*. 2004 Jan-Feb;87(1):36-42.

Owens WB. Blood pressure control in acute cerebrovascular disease. *J Clin Hypertens* 2011; 13(3):205-211.

OPAS, Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em http://www.paho.org/bra../index.php?option=com_content&view=article&id=397&Itemid=1 Acesso 09/12/2014

Polly DM, Paciullo CA, Hatfield CJ. Management of hypertensive emergency and urgency. *Adv Emerg Nurs J* 2011; 33(2):127-136.

Patocková J, Krsiak M, Marhol P, Tůmová E. Cerebrolysin inhibits lipid peroxidation induced by insulin hypoglycemia in the brain and heart of mice. *Physiol Res*. 2003;52(4):455-60.

Peotta VA, Gava AL, Vasquez EC, Meyrelles SS (2007). Evaluation of baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 85(8): 761-766.

Patil CS, Singh VP, Kulkarni SK. Modulatory effect of sildenafil in diabetes and electroconvulsive shock-induced cognitive dysfunction in rats. *Pharmacol Rep*. 2006 May-Jun;58(3):373-80.

Rodrigues GJ, Lunardi CN, Lima RG, Santos CX, Laurindo FR, da Silva RS, Bendhack LM. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide*. 2008 May;18(3):176-83.

Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7(11):e50593.

Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin inhibits vascular superoxide

production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis*. 2009 Jan;202(1):58-67.

Rabelo LA, Cortes SF, Alvarez-Leite JI, Lemos VS. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. *Br J Pharmacol*. 2003 Apr;138(7):1215-20.

Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2005 Dec;(99):S57-65. Review.

Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2005 Dec;(99):S57-65

Rodrigues BP, Campagnaro BP, Balarini CM, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2013 Aug 28;12:128.

Raja SG, Nayak SH. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2004;78(4):1496–1506.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*. 2001 Dec 1;38(6):1382-7.

Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, Zhao L, Callaway CW, Hillas E, Zhang S, Cheng T, Inagami T, Ward K, Terreros DA, Lalouel JM. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension*. 1999 Dec;34(6):1265-74

Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front Physiol*. 2012 Dec 5;3:441.

Schäfer SC, Pellegrin M, Wyss C, Aubert JF, Nussberger J, Hayoz D, Lehr HA, Mazzolai L. Intravital microscopy reveals endothelial dysfunction in resistance arterioles in Angiotensin II-induced hypertension. *Hypertens Res*. 2012 Aug;35(8):855-61

Shukla N, Jones R, Persad R, Angelini GD, Jeremy JY. Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivative, NCX 911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. *Eur J Pharmacol*. 2005 Jul 11;517(3):224-31.

Skov J, Persson F, Frøkiær J, Christiansen JS. Tissue Renin-Angiotensin systems: a unifying hypothesis of metabolic disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Feb 28;5:23.

STEGBAUER J. et al. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. *PLoS One*, v. 8, n.11, Jan., 2013.

Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 1988 Feb;11(2 Pt 2):1153-7.

Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*. 2013 Jan 18;216(2):R1-R17.

Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jun;85(11):4095-8.

Sayer G, Bhat G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol Clin*. 2014 Feb;32(1):21-32, vii.

Strawn WB, Richmond RS, Tallant EA, et al. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells. *Brit J Haematol* 2004; 126:120-126

Sadjadi J, Kramer GL, Yu CH, Welborn MB 3rd, Modrall JG. Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism. *J Surg Res*. 2005 Dec;129(2):272-7.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2010. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Disponível em Rev Bras Hipertens vol.17(1):7-10, 2010 / http://www.anad.org.br/profissionais/images/VI_Diretrizes_Bras_Hipertens_RDHA_6485.pdf Acesso 09/12/2014

Timponi CF, Oliveira NE, Arruda RM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Effects of the local anaesthetic ropivacaine on vascular reactivity in the mouse perfused mesenteric arteries. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006 May;98(5):518-20

Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Aug;30(8):1606-13.

Touyz RM: Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004, 44:248–252.

VIGITEL – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estatística e informação em saúde. 1ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

VALLOTTON M.B. et al. Interaction of vasopressin and angiotensin II in stimulation of prostacyclin synthesis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v. 257, n.5, p. 617-624, Nov., 1989.

Westermann D, Becher PM, Lindner D, Savvatis K, Xia Y, Fröhlich M, Hoffmann S, Schultheiss HP, Tschöpe C. Selective PDE5A inhibition with sildenafil rescues left ventricular dysfunction, inflammatory immune response and cardiac remodeling in angiotensin II-induced heart failure in vivo. *Basic Res Cardiol*. 2012 Nov;107(6):308. Erratum in: *Basic Res Cardiol*. 2013 Mar;108(2):327.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, Pedrazzini T. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension*. 1997 Apr;29(4):1025-30

WANG Y., ZHANG M.S., LIU Y. Nebivolol treatment improves resistant arterial function and reduces ventricular hypertrophy and angiotensin II in spontaneously hypertension rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, v. 14, n. 2, p. 146-55, Jun., 2013.

WHO, World Health Organization. 2013. A global brief on hypertension. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf?ua=1 Acesso 09/12/2014

Xie QY, Sun M, Yang TL, Sun ZL. Losartan reduces monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of 2K1C hypertensive rats. *Int J Cardiol*. 2006 Jun 7;110(1):60-6.

Yaguas K, Bautista R, Quiroz Y, Ferrebuz A, Pons H, Franco M, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension. *Am J Nephrol*. 2010;31(4):283-91.

Sildenafil Improves Vascular Endothelial Structure and Function in Renovascular Hypertension

Journal:	<i>Current Pharmaceutical Biotechnology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Articles
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Fahning, Bernah; Federal University of Espirito Santo, Physiological Sciences Dias, Ananda; Federal University of Espirito Santo, Physiological Sciences Oliveira, Jairo; Federal University of Espirito Santo, Department of Morphology Gava, Agata; Federal University of Espirito Santo, Physiological Sciences Gomes, Isabele; Federal University of Espirito Santo, Pharmaceutical Sciences Nogueira, Breno; Federal University of Espirito Santo, Department of Morphology Porto, Marcella; Federal University of Espirito Santo, Physiological Sciences Campagnaro, Bianca; Vila Velha University, Pharmaceutical Sciences Pereira, Thiago; Vila Velha University, Pharmaceutical Sciences Vasquez, Elisardo; Federal University of Espirito Santo, Physiological Sciences; Vila Velha University, Pharmaceutical Sciences Balarini, Camille; Federal University of Paraiba, Department of Physiology and Pathology Meyrelles, Silvana; Federal University of Espirito Santo, Physiological Sciences</p>
Keywords:	2K1C, endothelium, endothelial dysfunction, renovascular hypertension, resistance arteries, sildenafil

Sildenafil Improves Vascular Endothelial Structure and Function in Renovascular Hypertension

Bernah M Fahning¹, Ananda T Dias¹, Jairo P Oliveira², Agata L Gava¹, Marcella L Porto¹,
Isabele BS Gomes³, Breno V Nogueira², Bianca P Campagnaro⁴, Thiago M C Pereira^{4,5},
Elisardo C Vasquez^{1,4}, Camille M Balarini^{6*}, Silvana S Meyrelles^{1*}

¹Laboratory of Translational Physiology, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil

²Departmente of Morphological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil

³Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil

⁴Pharmaceutical Sciences Graduate Program, Vila Velha University, Vila Velha, ES, Brazil

⁵Federal Institute of Education, Science and Technology (IFES), Vila Velha, ES, Brazil

⁶Department of Physiology and Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Paraiba, Joao Pessoa, PB, Brazil

Running title: Sildenafil repairs endothelial dysfunction in 2K1C mice

E-mails:

Bernah M Fahning, bernahm.fahning@hotmail.com

Ananda T Dias, anandatd@yahoo.com.br

Jairo P Oliveira, oliveira.jp@outlook.com

Agata L Gava, agatagava@hotmail.com

Isabele BS Gomes, isabelebs@yahoo.com.br

Breno V Nogueira, brenovalentim@gmail.com

Marcella L Porto, cella.porto@gmail.com

Bianca P Campagnaro, biancacampagnaro@yahoo.com.br

Thiago M C Pereira, pereiratmc@gmail.com

Elisardo C Vasquez, evasquez@pq.cnpq.br

Camille M Balarini, camille.balarini@gmail.com

Silvana S Meyrelles, smeyrelles@terra.com.br

*Corresponding authors: Laboratory Translational Physiology, Department of Physiological Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil and Department of Physiology and Pathology, Health Sciences Center, Federal University of Paraiba, Joao Pessoa, PB, Brazil
<https://mc04.manuscriptcentral.com/cpb>

Abstract

For translational medicine, the discovery of new drugs or new potential uses for currently available drugs is crucial for treating of the resistant hypertension associated with renal artery stenosis. The phosphodiesterase 5 inhibitor sildenafil has been shown to reduce blood pressure and to improve the endothelium-dependent relaxation in the two-kidney one-clip (2K1C) mouse model of renovascular hypertension. In the present study, we evaluated the effects of sildenafil (40 mg/kg/day for two weeks) on the endothelial structure and contractile function in mesenteric resistance arteries 28 days after clipping the renal artery. At the end of the treatment, scanning electron microscopy images and in vitro dose-response curves to norepinephrine showed endothelium denudation and enhanced contractile responsiveness associated with increased oxidative stress in the hypertensive mice. Sildenafil treatment caused a significant recovery in the number of endothelial cells and abolished both the enhanced contractile responsiveness and the increased oxidative stress. These data suggest that sildenafil can be considered a promising therapeutic option to manage endothelial dysfunction and hypertension in resistant patients.

Key words: 2K1C, Endothelial cells, Endothelial dysfunction, Renovascular hypertension, Resistance arteries, Sildenafil

INTRODUCTION

Hypertension, which may be caused by environmental and genetic factors (primary form) or by an identified cause, such as renal, endocrine or vascular disease (secondary form), is a major health problem worldwide [1-4]. Among the various regulatory systems that affect blood pressure, the renin-angiotensin (Ang) system plays a key role. For instance, in conditions of renal artery stenosis, the decrease in renal artery blood flow increases the production of Ang II, which is a potent vasoconstrictor and pro-oxidant [4-6]. Moreover, patients suffering from this disease are more susceptible to developing resistant hypertension, a condition of uncontrolled high blood pressure despite treatment with at least three antihypertensive agents [7-10]. From the perspective of translational medicine, understanding the mechanisms underlying hypertension can contribute to the proposal of different treatment protocols, including new potential uses for currently available drugs [11].

For decades, renovascular hypertension has been induced rats by partially clipping one of the renal arteries (2-kidney 1-clip or 2K1C hypertension) [12-14]. Lately, as consequence of developments in biotechnology, the mouse has become an important model organism for investigating renovascular hypertension [15-19]. In a previous study, we demonstrated that 2K1C

mice exhibit an impaired endothelium-dependent vasodilatory response to acetylcholine and exacerbated vasoconstrictor response to α -adrenoceptor agonists [20]. In addition, we have demonstrated the beneficial effects of the phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor sildenafil on the high blood pressure and impaired endothelium-dependent vasodilation in this model of renovascular hypertension [19].

Considering all these factors, we tested the hypothesis that sildenafil can restore endothelial function in resistance vessels in 2K1C hypertensive mice, possibly via augmentation of nitric oxide (NO)/cGMP signaling and via its antioxidant properties.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Experiments were performed in male C57BL/6J mice (*Mus musculus*) weighting 23g. Animals were bred and maintained in the animal facility of Laboratory of Translational Physiology (Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES, Brazil). Mice received standard mouse chow and water *ad libitum* and were housed in individual plastic cages in a temperature (22°C), humidity (60%) and light-controlled room (12/12h light/dark cycle). All experimental procedures were performed in accordance with National Institutes of Health guidelines. Study protocols were previously approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA-EMESCAM Protocol # 02/2013).

Induction of renovascular hypertension and treatment protocol

To induce renovascular hypertension, the 2K1C model was used, as previously standardized in our laboratory [15-19,21]. Briefly, animals weighting 23g were anesthetized (ketamine 91 mg/kg + xylazine 9.1 mg/kg, i.p.) and had their left renal artery carefully exposed through a retroperitoneal flank incision. Using a surgical microscope (Opto Eletronica SA, model SM 2002, Belo Horizonte, MG, Brazil), a U-shaped silver clip (0.12 mm wide opening) was placed around the renal artery at a site proximal to abdominal aorta to decrease renal perfusion [5]. Sham animals were submitted to the same surgical procedure, except for the implantation of the clip around renal artery. Fourteen days after surgery, animals were divided into three different groups (8 to 10 animals per group): renovascular hypertensive mice treated with the PDE5-inhibitor sildenafil (Viagra®, Pfizer) in a dose of 40 mg/kg/day during 14 days by oral gavage (2K1C sildenafil); renovascular hypertensive mice (2K1C) and sham animals (Sham) were treated with vehicle. The effectiveness of treatment protocol was previously demonstrated by other studies in our laboratory [19,22,23]. Experiments were performed 28 days after the induction of hypertension or Sham surgery.

Hemodynamic measurements

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

Twenty six days after the induction of hypertension, mice were anesthetized (ketamine 91 mg/kg + xylazine 9.1 mg/kg, i.p.) and a catheter (0.040 mm outer × 0.025 mm inner diameters, MicroRenathane, Braintree Science, Massachusetts, USA) was inserted into right carotid artery for the recording of mean arterial pressure and heart rate. The free catheter end was tunneled under the skin to the level of shoulder blades. After 48 hours, hemodynamic measures were performed in freely moving and conscious mice. Arterial catheter was connected to a disposable blood pressure transducer (Cobe Laboratories, Colorado, USA) connected to an amplifier and a data acquisition system (MP100, Biopac Systems, California, USA). A period of 30 min was allowed for stabilization of cardiovascular parameters before recording arterial pressure and heart rate (Acknowledge software, Biopac Systems, California, USA).

21 22 **Endothelium scanning electron microscopy**

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

Mesenteric arteriolar beds were dissected free of connective tissue and fixed in paraformaldehyde (2%)-glutaraldehyde (2.5%) cacodylate buffer solution (0.1 M; pH 7.2) for 24 h, washed with cacodylate buffer and then postfixed in a solution of 1.0% osmium tetroxide with 1.25% potassium ferrocyanide for 1 h, washed again in cacodylate buffer and ultrapure water. A stereomicroscopy was used to obtain longitudinal section of 2nd-3rd-order mesenteric resistance arteries. Sections were finally dehydrated in ascending grades of ethanol, subjected to critical point drying in CO₂, coated with 10 nm of pure gold in a vacuum sputter coater and studied in a direct mode by use of a scanning electron microscope (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. USA). Digital images (x1000 and 3000 magnification) were randomly collected from the endothelium in longitudinal arterial sections.

43 44 **Isolation and identification of endothelial cells**

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

At the end of the treatment, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.), the midline of the abdomen was incised and the mesenteric arteriolar bed was isolated, minced and digested with type II collagenase (1000 U/mL) at 37°C for 60 min at constant agitation. The cellular digest was filtered through a sterile 70-µm nylon mesh to remove debris, centrifuged at 400 g for 10 min, and washed twice in PBS. The cell pellet was resuspended in freezing solution and stored at -80°C until further analysis. For flow cytometry analysis, the samples were thawed using a heated orbital shaker at 37 °C and immediately transferred to a round-bottom tube. The presence of endothelial cells in mesenteric arteriolar bed digest was confirmed using an APC-conjugated monoclonal antibody against APCCAM-1 (CD31). Following, 1 × 10⁵ cells were resuspended in PBS and incubated with 5 µL of CD31-APC for 20 min in the dark and at room temperature. In the flow cytometry analysis, an APC-conjugated rat IgG2a was used as an isotype-specific control to set the

1
2 threshold values. From each sample, 100,000 events have been generated by a FACSCanto II flow
3
4 cytometer (Becton Dickinson - BD, CA, USA) using an appropriated filter for APC (660 nm).
5
6

7 **Vascular *in vitro* studies**

8
9 Using a different group of animals, mice were euthanized after treatment with sodium
10 pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) and the mesenteric arteriolar bed was isolated for vascular studies as
11 previously described [18,20,24,]. Briefly, the superior mesenteric artery was cannulated, transferred
12 to a temperature-controlled chamber (37 °C) and perfused at a constant flow rate (3 mL/min) with an
13 oxygenated (95% O₂ - 5% CO₂) physiological salt solution (in mM: 130 NaCl, 4.7 KCl, 1.6
14 CaCl₂•2H₂O, 1.18 KH₂PO₄, 4.7 MgSO₄•7H₂O, 14.9 NaHCO₃, 0.026 EDTA, 11.1 glucose, pH 7.4).
15
16 The perfusion pressure was monitored using a T-tube inserted between the peristaltic pump (Peri-Star
17 Pro 4-channel pump, WPI, Lu Jia Zui District, Shangai, China) and the inflow cannula and connected
18 to a pressure transducer and data acquisition system (MP100, Biopac Systems, California, USA).
19
20 After a stabilization period, dose-response curves of norepinephrine (NE, 3 × 10⁻⁷ to 3 × 10⁻² M)
21 were generated in isolated mesenteric arteriolar bed. Vascular contractile responses were evaluated
22 based on changes in the perfusion pressure related to basal (Δ perfusion pressure). To access
23 mechanisms underlying the vascular responses *in vitro*, in separated preparations, some NE dose-
24 responses curves were performed in the absence of endothelium or using the NAD(P)H oxidase
25 inhibitor apocynin (30 μM). To assess the contribution of the endothelium to the contractile response
26 to NE, an air bubble was passed through the lumen of the mesenteric arteriolar bed for less than 1
27 min.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Tiobarbituric acid reactive species assay**

42 Arteriolar oxidative stress was evaluated by tiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay
43 [25]. The level of lipid peroxidation, which is related to oxidative stress was measured in mesenteric
44 arteriolar bed as malondialdehyde (MDA). MDA reacts with tiobarbituric acid as TBARS to produce
45 a red complex. Mesenteric arteriolar bed was collected and stored at -80°C until analysis. Tissue was
46 then cut into small pieces and kept in ice. A sample of 100 mg of tissue was mixed with 500 μL of
47 trichloroacetic acid (15%) and butylated hydroxytoluene (45 mM), homogenized and boiled at 100
48 °C during 15 min. Homogenate was centrifuged (15,000 g for 2 min) and a 300 μL aliquot of the
49 supernatant was collected and added to the same volume of tiobarbituric acid (0.73%). Samples were
50 incubated at 100 °C for 30 min and the absorbance at 540 nm was measured after cooling. The results
51 were expressed as nmol MDA/g of tissue.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Statistical analysis

1
2 Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical comparisons between two groups were
3 performed using t-test. Statistical comparisons between more than two means were performed using
4 1 or 2 way analysis of variance (ANOVA) as appropriated, followed by Bonferroni's *post hoc* test.
5 Statistical analyses were performed using Prism software (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San
6 Diego, CA, USA). A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.
7
8
9
10
11

12 RESULTS

13 Blood pressure and heart rate

14
15 The values of arterial pressure and heart rate measured in Sham and 2K1C animals 28 days
16 after surgery are summarized in Figure 1. As expected, 2K1C animals presented increase in mean
17 arterial pressure when compared to Sham group (105 ± 2 vs. 128 ± 4 mmHg, $p < 0.01$). Sildenafil
18 treatment during 14 days restored mean arterial pressure levels in 2K1C sildenafil group (115 ± 2
19 mmHg, $p < 0.05$ vs. 2K1C). The same pattern was observed in heart rate. Hypertension elicited an
20 increase in heart rate (441 ± 10 vs. 512 ± 7 bpm, $p < 0.01$), which was restored by sildenafil (471 ± 12
21 bpm, $p < 0.05$ vs. 2K1C).
22
23
24
25
26
27

28
29 In our previous publication with the same model exposed to vasodilator acetylcholine and
30 time course similar to the present study, we have reported the effect of sildenafil on the values of
31 plasma Ang peptides [19]. Briefly, Ang II levels were normalized in the plasma and increased in the
32 kidneys in the second phase of the hypertension in 2K1C mice. The treatment with sildenafil restored
33 Ang II to the same levels of the Sham group and markedly increased plasma and intrarenal levels of
34 Ang 1-7.
35
36
37
38
39
40

41 Structural changes in the endothelial surface

42
43 In an attempting to verify if the architecture of the endothelial surface was affected in this
44 model of arterial hypertension, second-to-third-order resistance vessels from the mesenteric arteriolar
45 bed were analyzed by scanning electron microscopy. As shown in the representative images in Figure
46 2, 2K1C hypertensive mice exhibited a marked damage of the endothelial surface, characterized by a
47 clear endothelial denudation compared with the Sham mice. In contrast, the intraluminal surface in
48 2K1C mice treated with sildenafil was greatly improved; the samples exhibited endothelial cells
49 irregularly arranged and typically solitary, but clearly demonstrating a less endothelial denudation of
50 the intraluminal face of the resistance vessels.
51
52
53
54
55
56

57
58 The quantification of endothelial cells in the mesenteric arteriolar bed was performed trough
59 flow cytometry analysis and the use of the specific CD31 antibody marker for endothelial cells. Figure
60 2C shows average percentage of CD31-positive endothelial cells (for every pool of 100,000 vessels
cells). Renovascular hypertensive mice exhibited a number of endothelial cells significantly

1
2 decreased ($2.7\pm 0.16\%$, $p<0.01$) compared with the Sham mice ($5.4\pm 0.4\%$). The number of endothelial
3 cells counted in the 2K1C animals treated with sildenafil was significantly improved compared with
4 nontreated 2K1C mice but not completely recovered ($4.2\pm 0.2\%$, $p<0.05$) when compared with the
5 Sham group.
6
7
8

11 **Vascular function *in vitro***

12 Vascular function studies were performed in all groups 28 days after surgery. The dose-
13 response curve to NE showed an enhanced increase in the perfusion pressure in 2K1C mice compared
14 with Sham mice (Fig. 3, top left graph) and it was significantly attenuated by sildenafil treatment.
15 The maximum contractile response to NE in mesenteric arteriolar bed was significantly increased in
16 2K1C hypertensive mice (37%, $p<0.01$) and it was normalized by the treatment with sildenafil (Table
17 1). No significant differences in sensitivity (pEC_{50}) were observed among the three groups.
18
19

20 To access if the vascular hypercontractility to NE was due to an endothelial dysfunction or if
21 it was a reflex of smooth muscle hyperresponsiveness, dose-response curves in mesenteric arteriolar
22 bed were performed in the absence of functional endothelium as shown in Figure 3 (top panels). The
23 removal of the endothelium increased the contractile response to NE in Sham mice (33%, $p<0.01$)
24 and in 2K1C mice treated with sildenafil (33%, $p<0.01$), but did not modify the enhanced response
25 to NE in the 2K1C hypertensive mice (Table 1). Accordingly, the difference in the areas under the
26 curves (area before - area after the endothelial removal) was significantly decreased in the 2K1C
27 hypertensive mice compared with Sham mice (86 ± 7 vs. 201 ± 27 a.u., $p<0.01$) (Table 1) and partially
28 recovered in 2K1C mice treated with sildenafil (134 ± 13 a.u., $p<0.05$). The sensitivity to NE
29 significantly affected by the endothelium removal only in the Sham group (from 4.5 ± 0.1 to 4.9 ± 0.2 ,
30 $p<0.05$) (Table 1).
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 In order to test if oxidative stress is involved in vascular hyperresponsiveness to α -
44 adrenoceptor, dose-response curves to NE were performed in the presence of apocynin, an inhibitor
45 of NADPH oxidase (Fig. 4 and Table 1). Apocynin blockade did not affect the dose-response curve
46 to NE in Sham mice and in 2K1C mice treated with sildenafil (Fig. 4, top panels). In contrast, the
47 blockade of NADPH oxidase with apocynin abolished the enhanced contractile response to NE in
48 2K1C hypertensive mice. The R_{max} in perfusion pressure was significantly changed from 162 ± 14 to
49 $115\pm 5\%$ ($p<0.01$) in the 2K1C hypertensive mice, but in the Sham mice and 2K1C mice treated with
50 sildenafil no significant changes were observed (Table 1). Consequently, the area under the curve to
51 NE was much greater in the 2K1C hypertensive mice than in the Sham group (~ 100 vs. 15 a.u.,
52 $p<0.01$). The area under the curve in the 2K1C mice treated with sildenafil was smaller (~ 5 a.u.) than
53 that observed in Sham mice. No significant changes in the sensitivity were observed among the three
54 groups before and after the endothelium removal (Table 1).
55
56
57
58
59
60

Reactive oxygen species

Lipid peroxidation was evaluated by the tiobarbituric acid reactive species assay (TBARS) to the determination of general oxidative stress in mesenteric arteriolar bed 28 days after surgery. The 2K1C hypertensive mice exhibited a significant increase (~60%) of oxidative stress when compared to Sham (102 ± 9 vs. 64 ± 7 nmol MDA/g of tissue, $p<0.05$) (Figure 5). The treatment of 2K1C mice with sildenafil restored the levels of oxidative stress to values similar to those observed in the Sham group (64 ± 13 nmol MDA/g of tissue).

DISCUSSION

In normal conditions, the basal contractile state of a resistance vessel is result of the balance between factors that favor vasodilation and factors that lead to vasoconstriction. In contrast, impaired relaxation and enhanced vasoconstriction in response to specific agonists, which is referred to as endothelial dysfunction, are observed in several cardiovascular diseases, such as arterial hypertension and atherosclerosis. Therefore, the treatment of these disorders may include the restoration of both the relaxation and contractile processes. We have shown in a previous study that chronic treatment with the PDE5 inhibitor sildenafil restores normal relaxation in response to acetylcholine in murine models of renovascular hypertension [19] and atherosclerosis [22]. In the present study, our data clearly demonstrated that similar to the response in atherosclerotic mice [26], sildenafil restored the normal contractile response of α_1 -adrenoceptor agonist NE in 2K1C hypertensive mice.

PDE5 inhibitors, which are traditionally used to treat erectile dysfunction and pulmonary hypertension, exert systemic antihypertensive effects [18,19,27,28]. This improvement on high blood pressure was confirmed in the present study, in which a 14-day treatment with sildenafil after the first phase of renovascular hypertension resulted in a significant reduction in blood pressure. These data from the hypertensive mouse model corroborate studies that have also been performed using the rat model [29,30]. One of the mechanisms by which sildenafil exerts this hemodynamic effect could be through a decrease in the plasma and tissue Ang II levels and an increase in the Ang 1-7 levels [19].

Traditional cardiovascular risk factors affect vascular signaling and endothelial structure and function. We used scanning electron microscopy to examine the structure of the endothelial surface of second-to-third-order arteries, and flow cytometer to count the number of endothelial cells using a specific marker of these cells. The finding of endothelial denudation (decrease in the number of endothelial cells) on the internal surface of the resistance arteries in 2K1C mice supports the general concept that the main cardiovascular risk factors affect both the structure and function of the endothelium [31]. Our results also showed that the animals that were treated with sildenafil exhibited a considerable recovery in the number of endothelial cells, which were solitary cells or cells that were

1
2 irregularly arranged on the intraluminal surface, rather than exhibiting endothelial denudation. Bone
3 marrow-derived cells can differentiate into mature endothelial progenitor cells, which play a role in
4 the vascular reparative process, as recently reviewed [32] and sildenafil appears to stimulate this
5 process [33,34]. These facts suggest that the mechanism through which sildenafil restores the
6 endothelial function could be the stimulation of circulating endothelial progenitor cells. Therefore,
7 further studies should focus on the stimulatory effect of sildenafil on endothelial cells in 2K1C
8 hypertensive mice. These new findings in this model of renovascular hypertension suggests that the
9 surface of endothelial cells could be a potential target for a pharmacological therapy with sildenafil
10 to improve vascular homeostasis in this and related-diseases.
11
12
13
14
15
16
17

18 Endothelial dysfunction is an important abnormal function that is commonly observed in
19 several cardiovascular diseases [35] such as experimental models of atherosclerosis and arterial
20 hypertension [36-38]. The finding that the maximum contractile response to the α_1 -adrenoceptor
21 agonist in 2K1C hypertensive mice was similar before and after removal of the endothelium reveals
22 marked impairment of endothelial function in this murine model of renovascular hypertension.
23
24
25
26

27 A growing number of studies are focused on drugs with the potential to improve NO/cGMP
28 signaling and, therefore, to repair the endothelial dysfunction that accompanies renovascular
29 hypertension [19]. The altered endothelial architecture observed in 2K1C hypertensive mice may
30 partly account for the reduced NO bioavailability that we have reported for this model of renovascular
31 hypertension [18,19,23]. In this context, sildenafil appears to be a promising alternative because in
32 addition to its function as an inhibitor of the degradation of cGMP due to its pleiotropic activities,
33 sildenafil effectively improved the endothelial architecture, the number of these cells and the
34 endothelial function in renovascular hypertensive mice. Moreover, others have shown that sildenafil
35 upregulates eNOS and soluble guanylate cyclase enzymes, increases the NO synthase cofactor BH₄,
36 inhibits NADPH oxidase activity and increases enzymatic antioxidant activities, all leading to
37 increased of NO bioavailability [39-43]. The above properties of sildenafil could explain the
38 restauration of endothelial function that we observed in the 2K1C mice treated with this drug. The
39 antioxidative effects of sildenafil are consistent with previous *in vivo* data from our laboratory
40 showing that chronic inhibition of PDE5 cause a decrease in oxidative-induced damage to blood
41 mononuclear, liver and kidney cells [18,23] and in both conductance [22] and resistance [19] vessels.
42 These beneficial pleiotropic effects of sildenafil in different tissues may result from the
43 pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics, including its high volume of distribution
44 [23,39], and from the ubiquity of the second-messenger target cGMP in cytoprotective signaling
45 pathways [45] which are distributed in various tissues/cells expressing PDE5, such as blood cells
46 [46], the liver, the kidney and vessels [47]. Additionally, it has been demonstrated that sildenafil
47 improves the balance between Ang II and Ang 1-7 levels and increases the bioavailability of NO in
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 renovascular hypertensive mice [18,19]. Despite the above discoveries, more studies are necessary to
3 obtain a better understanding of how the actions of sildenafil are linked to the endothelial architecture
4 on internal surface of vessels.
5
6

7 Another important finding was the relevant participation of ROS-dependent NADPH oxidase,
8 as demonstrated by the abolishment of the enhanced contractile response when NADPH oxidase was
9 blocked with apocynin. We have observed in the current study that the 2K1C mice exhibited an
10 increase in lipid peroxidation products in the mesenteric arteries, confirming the increased oxidative
11 stress in this region. This finding is in agreement with previous studies and could be explained by the
12 reduced activity of antioxidant enzymes [29,48]. Another factor supporting the efficacy of sildenafil
13 reducing the oxidative stress in renovascular hypertension was its ability to decrease the MDA levels
14 in the resistance vessels, which may be an important mechanism that restores endothelial function in
15 this model of hypertension.
16
17
18
19
20
21
22

23 In summary, the novelty of this study is that we provide the first demonstration that sildenafil
24 improves the architecture of the endothelial surface and corrects the vascular contractile
25 hyperresponsiveness, which is one of the characteristics of the endothelial dysfunction in this model
26 of hypertension. Therefore, the present data support the increasing number of proposals for adding
27 the PDE5 inhibitors to recommended group of currently available anti-hypertensive agents, especially
28 as an additional drug for treating patients with resistant hypertension.
29
30
31
32
33
34
35
36

37 **CONFLICT OF INTEREST**

38
39 The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.
40
41

42 **ACKNOWLEDGEMENTS**

43
44
45 ECV and SSM are supported by the National Council for the Development of Science and
46 Technology (CNPq, Ref. 302582/2011-8, 476525/2012-8 and 302535/2009-8 Grants, respectively)
47 and the State Agency for the Development of Science and Technology (FAPES/Universal
48 012/2011/PROC. 54498465).
49
50
51
52
53
54

55 **ABBREVIATIONS**

56
57 2K1C = two-kidney one-clip AUC = area under the curve
58
59 ED = endothelial dysfunction MDA = malondialdehyde
60
NE = Norepinephrine NO = nitric oxide

1
2 PDE = phosphodiesterase
3

4 pEC₅₀ = log of the concentration of agonist that produced half of R_{max}
5
6

7 R_{max} = maximum response
8

TBARS = thiobarbituric acid-reactive substances
9
10
11

12 REFERENCES 13

- 14
15 [1] Giles, T.D.; Materson, B.J.; Cohn, J.N.; Kostis, J.B. Definition and classification of
16 hypertension: an update. *J. Clin. Hypertens.*, **2009**, *11*(11):611-614.
17
18 [2] Chokshi, N.P.; Grossman, E.; Messerli, F.H. Blood pressure and diabetes: vicious twins.
19 *Heart.*, **2013**, *99*(8):577-585.
20
21 [3] Miralles, M.; Corominas, A.; Cotillas, J.; Castro, F.; Clara, A.; Vidal-Barraquer, F.
22 Screening for carotid and renal artery stenoses in patients with aortoiliac disease. *Ann Vasc*
23 *Surg.*, **1998**, *12*(1):17-22.
24
25 [4] Lao, D.; Parasher, P.S.; Cho, K.C.; Yeghiazarians, Y. Atherosclerotic renal artery stenosis--
26 diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.*, **2011**, *86*(7):649-657.
27
28 [5] Navar, L.G.; Zou, L.; Von Thun, A.; Tarng Wang, C.; Imig, J.D.; Mitchell, K.D. Unraveling
29 the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol Sci.*, **1998**, *13*:170-176.
30
31 [6] Santos, R.A.; Ferreira, A.J.; Verano-Braga, T.; Bader, M. Angiotensin-converting enzyme 2,
32 angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol.*,
33 **2013**, *216*(2):R1-R17.
34
35 [7] Faselis, C.; Doumas, M.; Papademetriou, V. Common secondary causes of resistant
36 hypertension and rational for treatment. *Int J Hypertens.*, **2011**, *2011*:236239.
37
38 [8] Carey, R.M. Resistant hypertension. *Hypertension.*, **2013**, *61*(4):746-750.
39
40 [9] Kumar, N.; Calhoun, D.A.; Dudenbostel, T. Management of patients with resistant
41 hypertension: current treatment options. *Integr Blood Press Control.*, **2013**, *6*:139-151.
42
43 [10] Vongpatanasin, W. Resistant hypertension: a review of diagnosis and management. *JAMA.*,
44 **2014**, *311*(21):2216-2224.
45
46 [11] Woolf, S.H. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA.*, **2008**,
47 *299*(2):211-213.
48
49 [12] Cabral, A.M.; Vasquez, E.C. Time course of cardiac sympathetic and vagal tone changes in
50 renovascular hypertensive rats. *Am J Hypertens.*, **1991**, *4*(10Pt1):815-819.
51
52 [13] Moyses, M.R.; Cabral, A.M.; Marçal, D.; Vasquez, E.C. Sigmoidal curve-fitting of
53 baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats., *Braz J Med Biol Res.*,
54 **1994**, *27*(6):1419-1424.
55
56
57
58
59
60

- 1
2 [14] Pereira, T.M.; Balarini, C.M.; Silva, I.V.; Cabral, A.M.; Vasquez, E.C.; Meyrelles, S.S.
3
4 Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. *Braz*
5
6 *J Med Biol Res.*, **2009**, *42*(7):685-691.
- 7 [15] Nogueira, B.V.; Palomino, Z.; Porto, M.L.; Balarini, C.M.; Pereira, T.M.; Baldo, M.P.;
8
9 Casarini, D.E.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Granulocyte colony stimulating factor
10
11 prevents kidney infarction and attenuates renovascular hypertension. *Cell Physiol Biochem.*,
12
13 **2012**, *29*(1-2):143-52.
- 14 [16] Campagnaro, B.P.; Tonini, C.L.; Doche, L.M.; Nogueira, B.V.; Vasquez, E.C.; Meyrelles,
15
16 S.S. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells.
17
18 *DNA Cell Biol.*, **2013**, *32*(8):458-66.
- 19 [17] Campagnaro, B.P.; Tonini, C.L.; Nogueira, B.V.; Casarini, D.E.; Vasquez, E.C.; Meyrelles,
20
21 S.S. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from
22
23 Angiotensin-dependent hypertensive mice. *Int J Hypertens.*, **2013**, *2013*:305202.
- 24 [18] Dias, A.T.; Cintra, A.S.; Frossard, J.C.; Palomino, Z.; Casarini, D.E.; Gomes, I.; Balarini,
25
26 C.M.; Gava, A.L.; Campagnaro, B.P.; Pereira, T.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Inhibition
27
28 of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *J Transl*
29
30 *Med.*, **2014**, *12*(1):250.
- 31 [19] Dias, A.T.; Rodrigues, B.P.; Porto, M.L.; Gava, A.L.; Balarini, C.M.; Freitas, F.P.;
32
33 Palomino, Z.; Casarini, D.E.; Campagnaro, B.P.; Pereira, T.M.; Meyrelles, S.S.; Vasquez,
34
35 E.C. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice
36
37 with renovascular hypertension. *J Transl Med.*, **2014**, *12*:35.
- 38 [20] Arruda, R.M.; Peotta, V.A.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Evaluation of vascular function
39
40 in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension.
41
42 *Hypertension.*, **2005**, *46*(4):932-936.
- 43 [21] Gava, A.L.; Peotta, V.A.; Cabral, A.M.; Vasquez, E.C.; Meyrelles, S.S. Overexpression of
44
45 eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physiol*
46
47 *Pharmacol.*, **2008**, *86*(7):458-464.
- 48 [22] Balarini, C.M.; Leal, M.A.; Gomes, I.B.; Pereira, T.M.; Gava, A.L.; Meyrelles, S.S.;
49
50 Vasquez, E.C. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout
51
52 mouse. *J Transl Med.*, **2013**, *11*:3.
- 53 [23] Rodrigues, B.P.; Campagnaro, B.P.; Balarini, C.M.; Pereira, T.M.; Meyrelles, S.S.;
54
55 Vasquez, E.C. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model
56
57 of spontaneous atherosclerosis. *Lipids Health Dis.*, **2013**, *12*:128.
- 58 [24] Cola, M.S.; Gava, A.L.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Endothelial dysfunction of
59
60 resistance vessels in female apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids Health Dis.*, **2010**, *9*:51.

- 1
2 [25] Monteiro, M.M.; França-Silva, M.S.; Alves, N.F.; Porpino, S.K.; Braga, V.A. Quercetin
3 improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Molecules.*, **2012**,
4 *17*(11):12997-13008.
5
6
7 [26] Leal et al. submitted to Curr Pharmac Biotech 2014
8
9 [27] Vlachopoulos, C.; Ioakeimidis, N.; Rokkas, K.; Stefanadis, C. Cardiovascular effects of
10 phosphodiesterase type 5 inhibitors. *J Sex Med.* **2009**, *6*(3):658-674.
11
12 [28] Yaguas, K.; Bautista, R.; Quiroz, Y.; Ferrebuz, A.; Pons, H.; Franco, M.; Vaziri, N.D.;
13 Rodriguez-Iturbe, B. Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and
14 improves hypertension. *Am J Nephrol.*, **2010**, *31*(4):283-291.
15
16 [29] Guimarães, D.A.; Rizzi, E.; Ceron, C.S.; Pinheiro, L.C.; Gerlach, R.F.; Tanus-Santos, J.E.
17 Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but
18 only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biol.*, **2013**,
19 *1*(1):578-585.
20
21 [30] Stegbauer, J.; Friedrich, S.; Potthoff, S.A.; Broekmans, K.; Cortese-Krott, M.M.; Quack, I.;
22 Rump, L.C.; Koesling, D.; Mergia, E. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory
23 response in renovascular hypertension. *PLoS One.*, **2013**, *8*(11):e80674.
24
25 [31] Wang, J.; Widlansky, M.E. Cytoskeleton, cytoskeletal interactions, and vascular endothelial
26 function. *Cell Health Cytoskeleton*, **2012**, *4*.
27
28 [32] Liu, H.B.; Gong, Y.F.; Yu, C.J.; Sun, Y.Y.; Li, X.Y., Zhao, D.; Zhang, Z.R. Endothelial
29 progenitor cells in cardiovascular diseases: from biomarker to therapeutic agent.
30 *Regenerative Med Res.*, **2013**, *1*:9.
31
32 [33] Dussault, S.; Maingrette, F.; Ménard, C.; Michaud, S.E.; Haddad, P.; Groleau, J.; Turgeon,
33 J.; Perez, G.; Rivard, A. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and
34 improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-
35 deficient mice. *Hypertension*, **2009**, *54*(5),1043-1049.
36
37 [34] Foresta, C.; De Toni, L.; Di Mambro, A.; Garolla, A.; Ferlin, A.; Zuccarello, D. The PDE5
38 inhibitor sildenafil increases circulating endothelial progenitor cells and CXCR4 expression.
39 *J. Sex Med.*, **2009**, *6*(2),369-372.
40
41 [35] Lee, P.S.; Poh, K.K. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem*
42 *Cells.*, **2014**, *6*(3):355-366.
43
44 [36] Giachini, F.R.; Lima, V.V.; Carneiro, F.S.; Tostes, R.C.; Webb, R.C. Decreased cGMP level
45 contributes to increased contraction in arteries from hypertensive rats: role of
46 phosphodiesterase 1. *Hypertension.*, **2011**, *57*(3):655-63.
47
48 [37] Meyrelles, S.S.; Peotta, V.A.; Pereira, T.M.C.; Vasquez, E.C. Endothelial dysfunction in the
49 apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids*
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2 *Health Dis.*, **2011**,14,10,211.
- 3
- 4 [38] Vasquez, E.C.; Peotta, V.A.; Gava, A.L.; Pereira, T.M.; Meyrelles, S.S. Cardiac and
5 vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J. Biomed. Sci.*, **2012**,19,22.
- 6
- 7 [39] Nichols, D.J.; Muirhead, G.J.; Harness, JA. Pharmacokinetics of sildenafil after single oral
8 doses in healthy male subjects: absolute bioavailability, food effects and dose
9 proportionality. *Br J Clin Pharmacol.*, **2002**, 53(Suppl 1):5S-12S.
- 10
- 11 [40] Koupparis, A.J.; Jeremy, J.Y.; Muzaffar, S.; Persad, R.; Shukla, N. Sildenafil inhibits the
12 formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the
13 thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU Int.*,
14 **2005**, 96(3):423-427.
- 15
- 16 [41] Schäfer, A.; Fraccarollo, D.; Pfürtsch, S.; Flierl, U.; Vogt, C.; Pfrang, J.; Kobsar, A.; Renné,
17 T.; Eigenthaler, M.; Ertl, G.; Bauersachs, J. Improvement of vascular function by acute and
18 chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. *Br J*
19 *Pharmacol.*, **2008**, 153(5):886-893.
- 20
- 21 [42] Ebrahimi, F.; Shafaroodi, H.; Asadi, S.; Nezami, B.G.; Ghasemi, M.; Rahimpour, S.;
22 Hashemi, M.; Doostar, Y.; Dehpour, A.R. Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in
23 diabetic mice: reduction of oxidative stress as a possible mechanism. *Can J Physiol*
24 *Pharmacol.*, **2009**, 87(7):556-564.
- 25
- 26 [43] Lee, K.C.; Yang, Y.Y.; Huang, Y.T.; Lee, F.Y.; Hou, M.C.; Lin, H.C.; Lee, S.D.
27 Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in
28 rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability. *Clin Sci (Lond.)*, **2010**, 119(1):45-
29 55.
- 30
- 31 [44] Inan, M.; Uz, Y.H.; Kizilay, G.; Topcu-Tarladacalisir, Y.; Sapmaz-Metin, M.; Akpolat, M.;
32 Aydogdu, N. Protective effect of sildenafil on liver injury induced by intestinal
33 ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg.*, **2013**, 48(8):1707-1715.
- 34
- 35 [45] Das, A.; Durrant, D.; Mitchell, C.; Mayton, E.; Hoke, N.N.; Salloum, F.N.; Park, M.A.;
36 Qureshi, I.; Lee, R.; Dent, P.; Kukreja, R.C. Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy
37 of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U*
38 *S A.*, **2010**, 107(42):18202-18207.
- 39
- 40 [46] Essayan, D.M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Allergy Clin Immunol.*, **2001**,
41 *108*(5):671-680.
- 42
- 43 [47] Giordano, D.; De Stefano, M.E.; Citro, G.; Modica, A.; Giorgi, M. Expression of cGMP-
44 binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an
45 antibody against the enzyme amino-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.*, **2001**, 1539(1-
46 2):16-27.
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- [48] Costa, C.A.; Amaral, T.A.; Carvalho, L.C.; Ognibene, D.T.; da Silva, A.F.; Moss, M.B.; Valença, S.S.; de Moura, R.S.; Resende, A.C. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. *Am J Hypertens.*, **2009**, 22(12), 1242-1249.

For Review Only

Table 1. Effects of sildenafil on parameters of the dose-response curves to norepinephrine in basal conditions and the contribution of the endothelium (removal) and NADPH oxidase blockade (apocynin) to the endothelial dysfunction in Sham, 2K1C mice and 2K1C hypertensive mice treated with sildenafil.

Curve parameters	Sham	2K1C	2K1C sildenafil
R_{max} (%)			
Norepinephrine	118±12	162±14**	116±9 ^{##}
Norepinephrine without endothelium	157±13 ^{aa}	170±14	154±11 ^{aa}

Norepinephrine under Apocynin	120±11	115±5 ^a	108±8
<hr/>			
pEC ₅₀ (-log M)			
Norepinephrine	4.5±0.1	4.9±0.5	4.5±0.3
Norepinephrine without endothelium	4.9±0.2 ^a	5.0±0.2	4.8±0.4
Norepinephrine under Apocynin	4.6±0.2	5.0±0.4	4.5±0.5
<hr/>			
Δ Area under the curve (arbitrary units)			
Endothelium removal	201±27	86±7**	134±13* ^{##}
Norepinephrine and Apocynin	15±6	101±16**	4±2 ^{##}

R_{max}, maximal response (efficacy). pEC₅₀, the negative logarithm of the concentration required to produce 50% of the R_{max} (sensitivity). Values are mean±SEM of 8-12 mice per group. **p<0.01 vs. Sham group; ^{##}p<0.01 vs. 2K1C vehicle; ^ap<0.05 and ^{aa}p<0.01 vs. respective control.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of sildenafil on resting values of mean arterial pressure and heart rate in the mouse model of 2K1C renovascular hypertension compared with non-treated 2K1C and Sham mice. Values are means \pm SEM for n= 6 per group. *p<0.05 and **p<0.01.

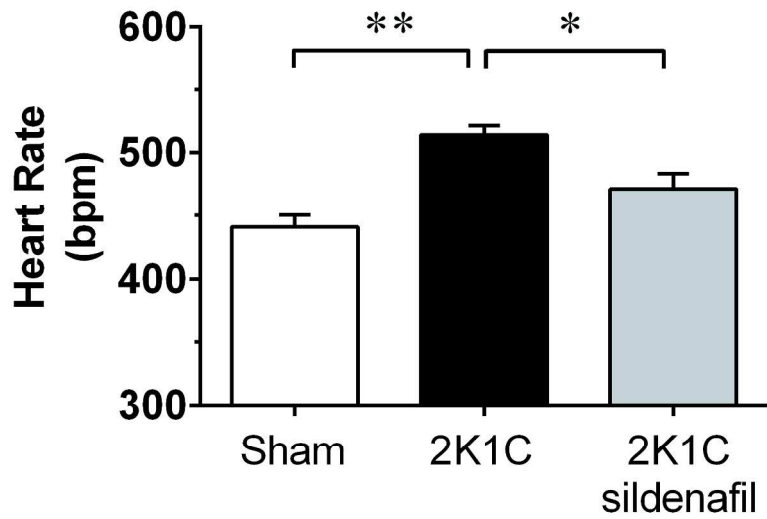
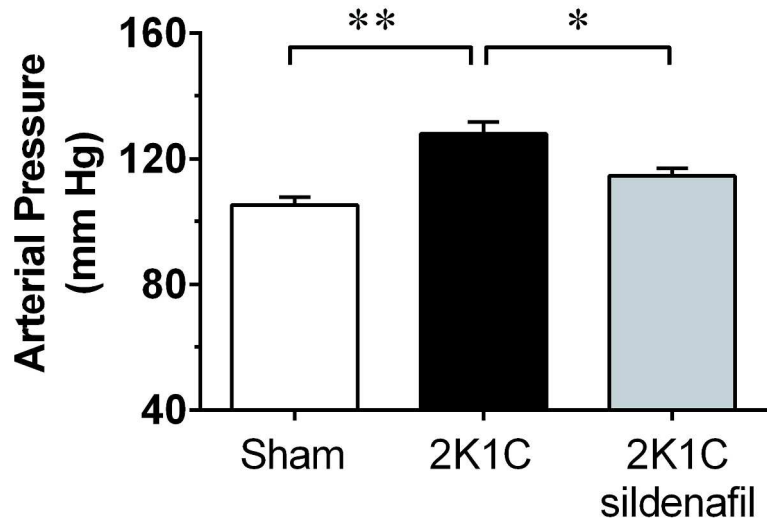
Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) showing the endothelial structure of vessels in Sham and 2K1C hypertensive mice treated with vehicle or sildenafil. Top image panels show representative second-order resistance arteries at low (A, vessel, x1000) and high (B, luminal surface, x3000) magnification. Scale bar: 10 μ m (A) and 5 μ m (B). Yellow arrow: endothelial cell; asterisk: endothelial denudation; red arrow: erythrocyte. Bottom bar graph shows average number of endothelial cells counted through flow cytometry and using specific markers. Values are means \pm SEM for 5 animals per group. *p<0.05 compared with sham group and #p<0.05 compared with 2K1C mice.

Figure 3. Effects of sildenafil on the contractions induced by norepinephrine in mesenteric arteriolar bed in 2K1C hypertensive mice compared to non-treated and to Sham mice (Top left graph). Top right graph shows the changes in the dose-response contractions to norepinephrine after the endothelium removal. The bottom graphs show the norepinephrine-induced contractions in mesenteric arteriolar bed in each of the three groups before (E⁺) and after removal of the endothelium (E). Dashed line refers to maximum response of the Sham group under normal conditions. Values are means \pm SEM for n= 6 to 8 animals per group. *p<0.05 vs. Sham and #p<0.05 vs. 2K1C Sildenafil groups.

Figure 4. Effects of sildenafil on the vasocontraction induced by norepinephrine in mesenteric arteriolar bed in 2K1C hypertensive mice compared to non-treated and to Sham mice under normal conditions (Control) or after the blockade of NADPH oxidase with apocynin. Dashed line refers to maximum response of the Sham group under normal conditions. Values are means \pm SEM for n= 6 to 8 animals per group. *p<0.05 vs. Sham and #p<0.05 vs. 2K1C Sildenafil groups.

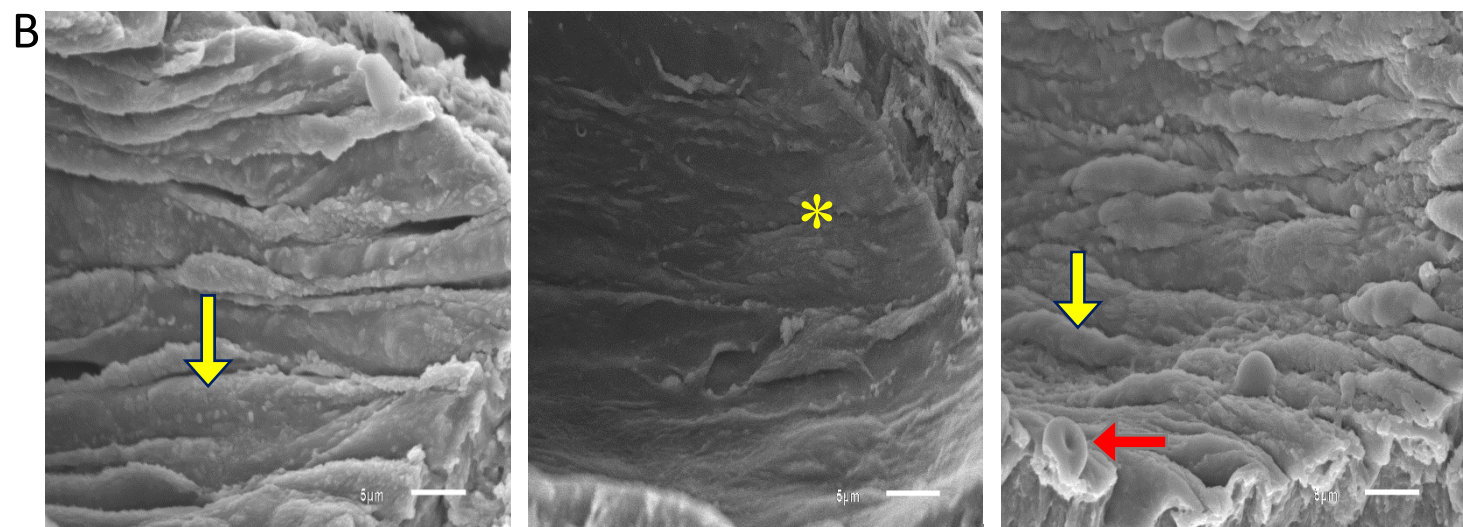
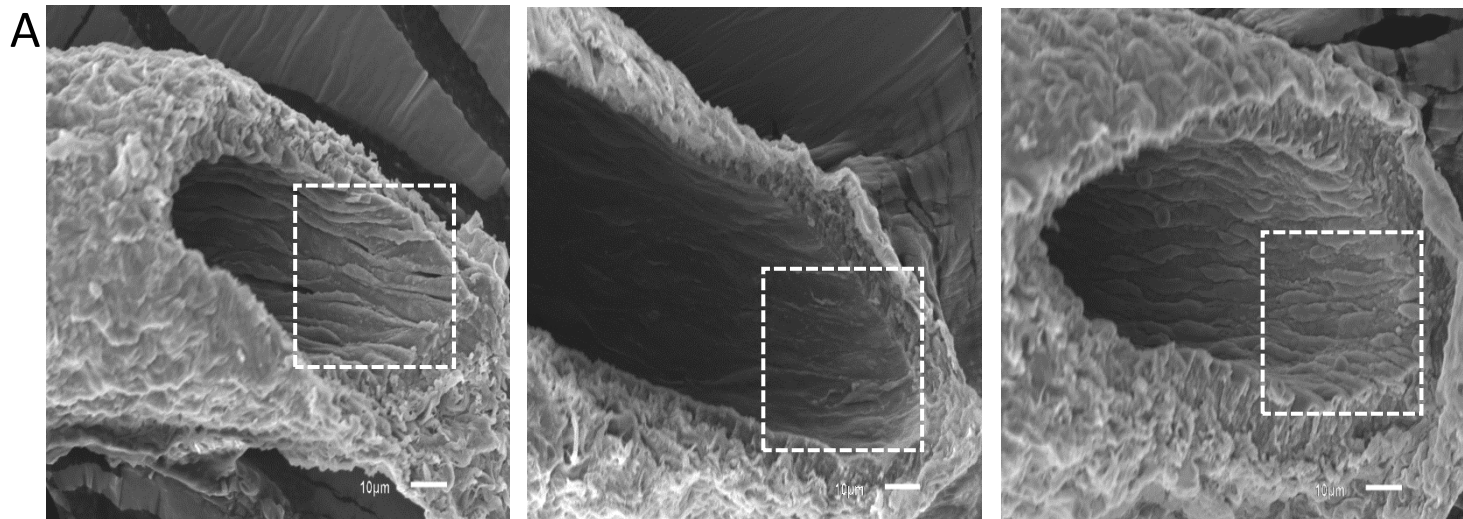
1
2 **Figure 5.** Effects of sildenafil on oxidative stress, assessed by thiobarbituric acid reactive substance
3 (TBARS) assay and in mesenteric arteriolar bed from 2K1C hypertensive mice compared to non-
4 treated and to Sham mice. MDA: malondialdehyde. Values are means \pm SEM for n= 6 to 8 animals
5 per group. *p<0.05
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Review Only



189x271mm (300 x 300 DPI)

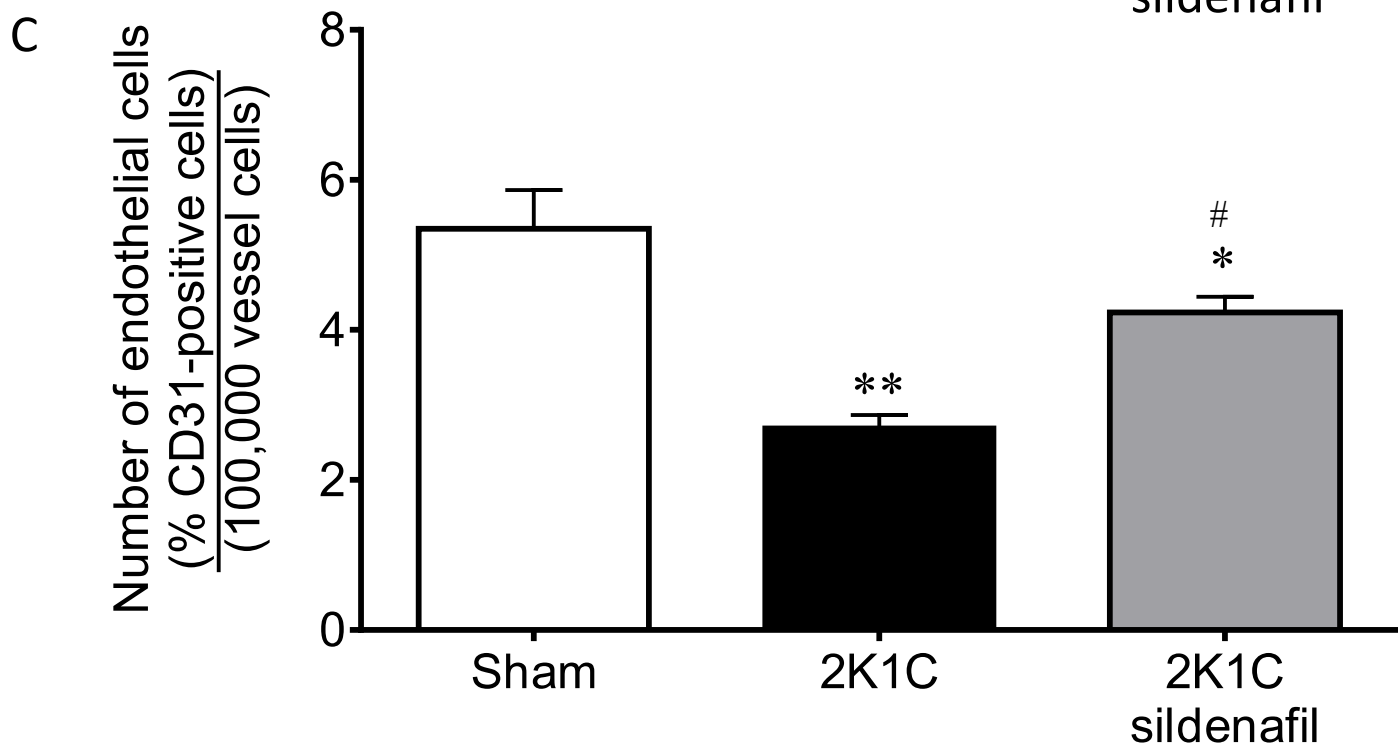
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



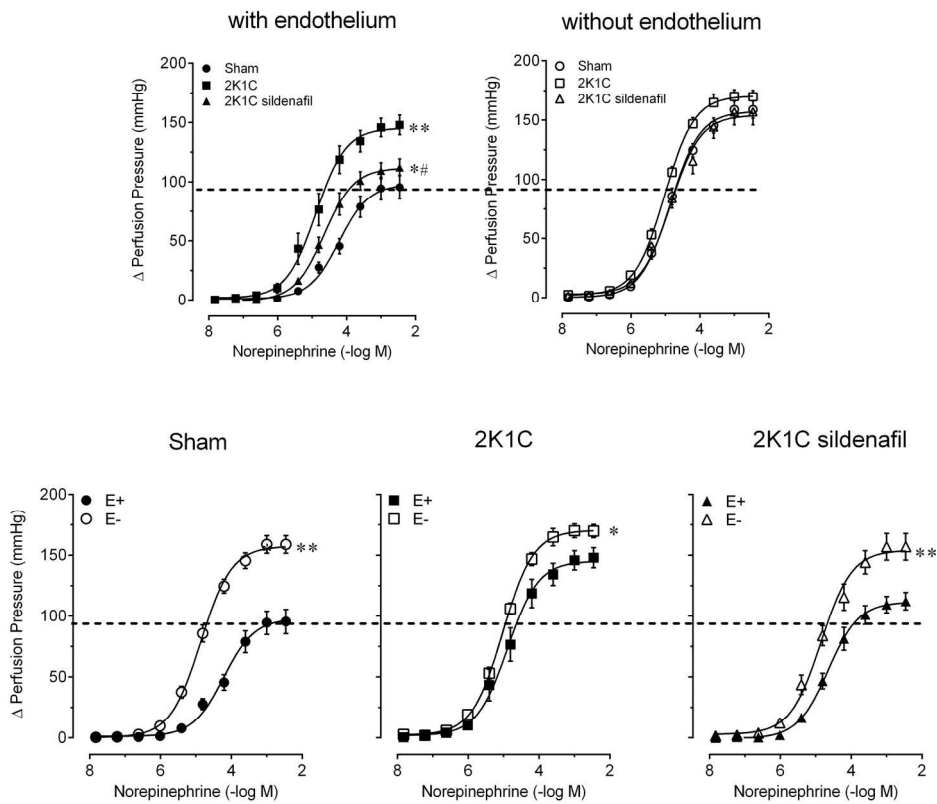
Sham

2K1C

2K1C
sildenafil



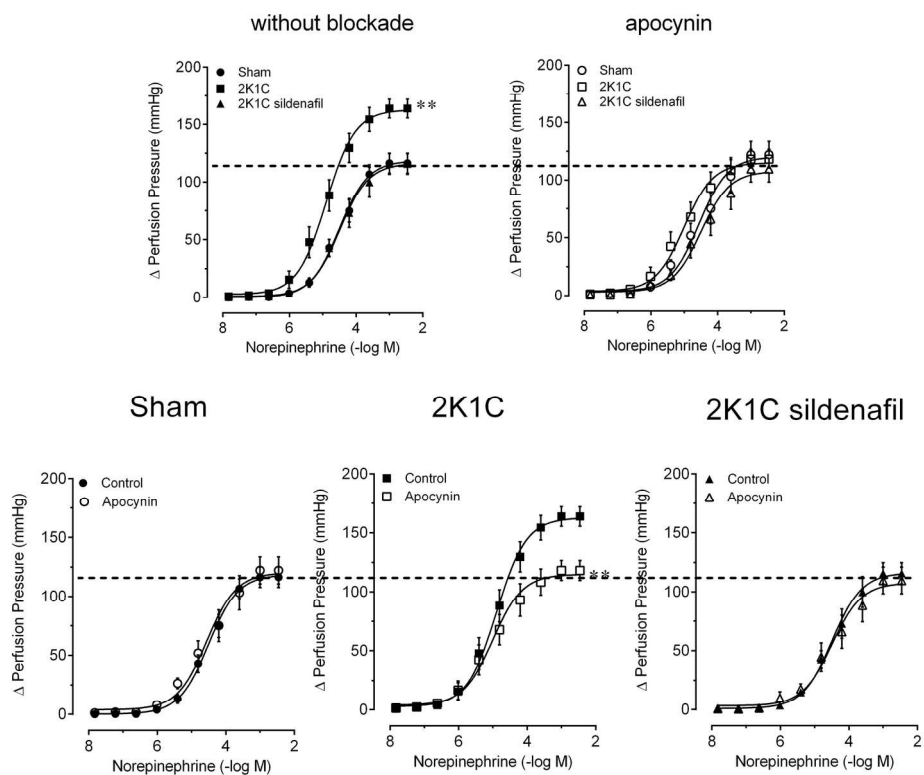
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



176x147mm (300 x 300 DPI)

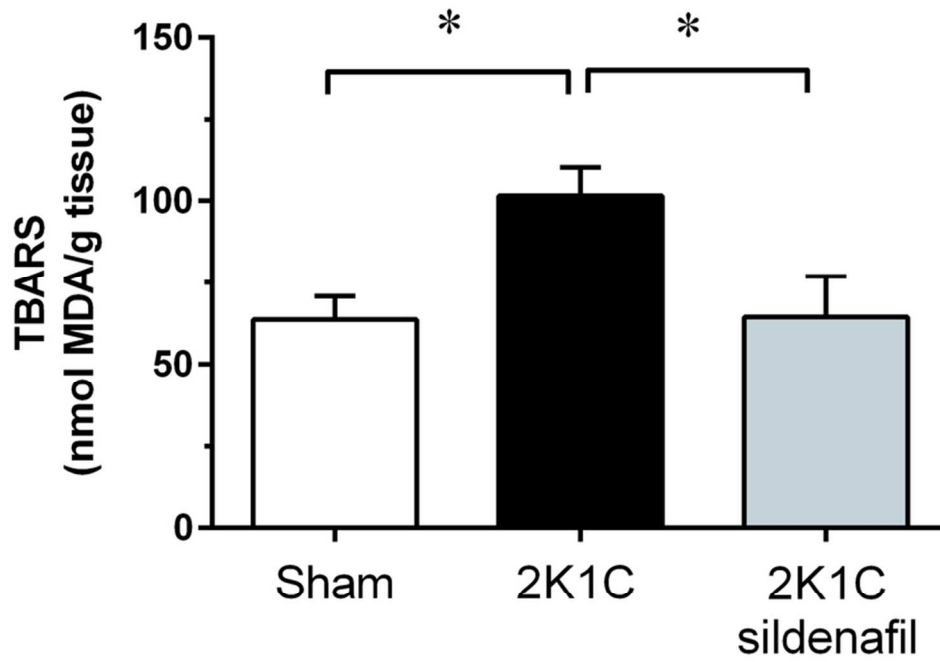
Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



176x142mm (300 x 300 DPI)

Only



76x56mm (300 x 300 DPI)

View Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60