

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE O
CONTROLE CENTRAL DA PRESSÃO ARTERIAL NA HIPERTENSÃO

CLÊNIA DE OLIVEIRA CAVALCANTI

JOÃO PESSOA – PB

2016

CLÊNIA DE OLIVEIRA CAVALCANTI

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE O
CONTROLE CENTRAL DA PRESSÃO ARTERIAL NA HIPERTENSÃO

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Biotecnologia da UFPB, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camille de Moura Balarini

JOÃO PESSOA - PB

2016

CLÊNIA DE OLIVEIRA CAVALCANTI

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE O
CONTROLE CENTRAL DA PRESSÃO ARTERIAL NA HIPERTENSÃO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Camille de Moura Balarini – Orientadora

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

Prof. Dr. Vinicius José Baccin Martins

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlene Gonçalves de Oliveira Cavalcanti e José Cavalcanti de Araújo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seu imenso amor! Por ser meu amigo e companheiro de todas as horas, aquele que me forma por primeiro.

A minha orientadora, Professora Camille de Moura Balarini pelo exemplo, ensino, incentivo, paciência e disponibilidade em sempre me ajudar.

Aos professores da banca de qualificação e defesa, pela colaboração neste trabalho.

Aos demais professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por fazerem parte da minha formação profissional.

A Universidade Federal da Paraíba (UFPB) por possibilitar a realização desta pesquisa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte técnico e financeiro.

A todas as pessoas que fazem parte do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Controle Neural da Pressão Arterial, em especial a Rafael e Alessandro pelo envolvimento neste trabalho.

Aos meus pais, Marlene e José Cavalcanti, por todo o zelo e cuidado com minha vida.

Aos demais familiares pelo apoio, em especial as minhas irmãs, Clécia e Clarissa. Obrigado, pela presença constante, pela escuta atenta nas alegrias e aflições.

Aos meus irmãos da Comunidade Doce Mãe de Deus pelo carinho fraterno e oração.

*“Quanto mais busco o Criador, mas compreendo o que
devo ser e fazer” Inaldo Alexandre*

CAVALCANTI, C.O. **Avaliação pré-clínica do efeito do citrato de sildenafil sobre o controle central da pressão arterial na hipertensão.** 2016. 80f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) está relacionada a diversos eventos cardiovasculares e desponta como uma das principais causas de óbito atualmente. Na fisiopatologia da HAS ocorrem disfunções no sistema nervoso autônomo que resultam em prejuízo aos mecanismos neuronais de controle central da pressão, em especial ao barorreflexo. Parte deste dano é mediado pelo aumento do estresse oxidativo. Abordagens terapêuticas que reduzam o estresse oxidativo podem se mostrar eficazes no combate a esta doença. O sildenafil é uma droga que atua inibindo a ação da fosfodiesterase 5 (PDE5) e tem sido observado que este promove uma diminuição do estresse oxidativo. A inibição da PDE5 se mostrou eficiente na melhora da função vascular e redução da pressão arterial em modelos experimentais. Contudo, seus efeitos sobre o controle barorreflexo da pressão arterial na vigência de hipertensão renovascular ainda não foram estudados. O estudo atual teve como objetivo avaliar se o tratamento com sildenafil é capaz de influenciar o controle barorreflexo da pressão arterial. Foram utilizados ratos Wistar, submetidos à cirurgia sham ou indutora de hipertensão renovascular (2R1C). Após 5 semanas, os animais receberam veículo (água destilada) ou citrato de sildenafil (45mg/Kg/dia) durante 7 dias, perfazendo 4 grupos: sham + veículo, sham + sildenafil, 2R1C + veículo, 2R1C + sildenafil. Ao fim do tratamento os animais foram canulados para medidas hemodinâmicas. Foram avaliados: pressão arterial média, frequência cardíaca, barorreflexo espontâneo e induzido, tônus autonômico cardíaco e estresse oxidativo sistêmico. (CEUA-UFPB protocolo n. 042/2015). O tratamento com sildenafil não apresentou efeitos significativos nos animais normotensos (121 ± 7 vs. 118 ± 3 mmHg), mas foi eficiente em reduzir a pressão arterial nos animais 2R1C (139 ± 5 vs. 175 ± 6 mmHg, $p < 0,01$). Os animais 2R1C apresentaram redução do ganho do barorreflexo induzido ($-1,93 \pm 0,12$) e espontâneo ($-1,90 \pm 0,22$), quando comparados aos sham ($-3,63 \pm 0,31$; $-3,95 \pm 0,46$). Estes parâmetros foram normalizados nos animais hipertensos pelo tratamento com sildenafil ($-3,18 \pm 0,23$; $-3,51 \pm 0,29$). Os bloqueios com atropina e propranolol revelaram alterações no balanço autonômico cardíaco na vigência de hipertensão, normalizadas, pelo tratamento, o tônus simpático ($-24,5 \pm 3$ bpm, $p < 0,01$) e o tônus vagal (110 ± 9 bpm, $p < 0,01$). O sildenafil também foi capaz de reduzir o estresse oxidativo sistêmico nos ratos 2R1C, quando comparado com os animais 2R1C + veículo ($1,04 \pm 0,07$ vs. $1,67 \pm 0,08$ nmol/ml). O tratamento com sildenafil melhorou o controle barorreflexo da pressão arterial, por meio da correção do desbalanço autonômico e redução do estresse oxidativo.

Palavras chave: Hipertensão resistente. Sildenafil. Barorreflexo. Óxido nítrico. Angiotensina II.

CAVALCANTI, C.O. **Preclinical Evaluation of the effect of sildenafil citrate in the central control of blood pressure in hypertension.** 2016. 80f. Dissertation (Masters in Physiology). Federal University of Paraíba, João Pessoa-PB.

ABSTRACT

Systemic hypertension (SH) is related to various cardiovascular events and emerged as a leading cause of death today. In the pathophysiology of hypertension occurring disorders in the autonomic nervous system that result in damage to neural mechanisms of central control of pressure, especially the baroreflex. Some of this damage is mediated by increased oxidative stress. Therapeutic approaches that reduce oxidative stress may prove effective in combating this disease. Sildenafil is a drug that acts by inhibiting the action of phosphodiesterase 5 (PDE5) and has been observed that this promotes a decrease in oxidative stress. The inhibition of PDE5 was efficient in improving vascular function and reduce blood pressure in experimental models. However, its effects on baroreflex control of blood pressure in the presence of renovascular hypertension have not yet been studied. The current study aimed to evaluate whether treatment with sildenafil is able to influence the baroreflex control of blood pressure. Wistar rats were subjected to sham surgery or inducer of renovascular hypertension (2K1C). After 5 weeks, the animals received vehicle (distilled water) or sildenafil citrate (45 mg / kg / day) for 7 days, totaling 4 groups: sham + vehicle, sham + sildenafil 2K1C + vehicle + 2K1C sildenafil. At the end of the treatment the animals were cannulated for hemodynamic measurements. They were evaluated: mean blood pressure, heart rate, spontaneous and induced baroreflex, cardiac autonomic tone and systemic oxidative stress. (CEUA-UFPB protocol no. 042/2015). Treatment with sildenafil had no significant effect in normotensive animals (121 ± 7 vs. 118 ± 3 mmHg), but was effective in reducing blood pressure in 2K1C animals (139 ± 5 vs. 175 ± 6 mmHg, $p < 0.01$) the 2K1C animals showed reduced gain induced baroreflex (-1.93 ± 0.12) and spontaneous (-1.90 ± 0.22) compared to the sham group (-3.63 ± 0.31 ; -3.95 ± 0.46). These parameters were normalized in hypertensive rats by treatment with sildenafil (-3.18 ± 0.23 -3.51 ± 0.29). Locks with atropine and propranolol showed alterations in the cardiac autonomic balance in the presence of hypertension, standardized, treatment, sympathetic tone (-24.5 ± 3 bpm, $p < 0.01$) and vagal tone (110 ± 9 bpm, $p < 0.01$). Sildenafil was also able to reduce systemic oxidative stress in 2K1C rats when compared to vehicle + 2K1C animals (1.04 ± 0.07 vs. 1.67 ± 0.08 nmol / ml). Treatment with sildenafil improved baroreflex control of blood pressure through the correction of the autonomic imbalance and reduction of oxidative stress.

Keywords: resistant hypertension. Sildenafil. Baroreflex, nitric oxide. Angiotensin II.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Aferentes e eferentes do barorreflexo. NTS, núcleo do trato solitário; CVLM, bulbo ventrolateral caudal; RVLM, bulbo ventrolateral rostral; CIL, coluna intermédio lateral; NA, núcleo ambíguo. GT, glutamato. Figura adaptada (DONAUGHY; RESTA; WAKER, 2002; VASQUEZ; PEOTTA; MEYRELLES, 2012).....	18
Figura 2:	Representação do sistema renina- angiotensina. ECA - enzima conversora de angiotensina, Ang- angiotensina, Aog - angiotensinogenio, AT1- receptor tipo I para Ang II, AT2 - receptor tipo II para Ang II, Mas - receptor Ang-(1–7), PCP – prolilcarboxipeptidase, NEP – endopeptidase neutra, (P)RR – receptor (pro)renina. Figura adaptada (SANTOS et al, 2013).....	20
Figura 3:	Mecanismos ativados pela estenose unilateral da artéria renal. Figura adaptada (NAVAR et al, 1998).....	21
Figura 4:	Mecanismo de ação de inibidores da PDE5. Figura adaptada (GHOFRANI, H. A; OSTERLOH, I. H; GRIMMINGER, 2006).	27
Figura 5:	Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental	35
Figura 6:	Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas.....	36
Figura 7:	Equipamento utilizado para medida de PA e FC.....	37
Figura 8:	Equipamento de análise bioquímica Chem Well	39
Figura 9:	Traçados representativos de um animal de cada grupo mostrando a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	42
Figura 10:	Efeito do tratamento com sildenafil durante 7 dias sobre a pressão arterial media (PAM) dos grupos experimentais. a $p<0,01$ vs. sham + veículo; b $p<0,01$ vs. sham + sildenafil; c $p<0,05$ vs. sham + veículo; d $p<0,01$ vs. 2R1C + veículo.	43
Figura 11:	Efeito do tratamento com sildenafil durante 7 dias sobre a frequência cardíaca (FC) dos grupos experimentais.....	43
Figura 12:	Traçados representativos de um animal de cada grupo mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC) em resposta ao nitropusiato de sódio (setas brancas) e fenilefrina (setas pretas).....	44

Figura 13:	Efeito do tratamento com sildenafil durante 7 dias na sensibilidade do barorreflexo ativado farmacologicamente (a $p<0,01$ vs. sham + veículo; b $p<0,05$ vs. sham + sildenafil; c $p<0,01$ versus 2R1C + veículo).....	45
Figura 14:	Efeito do tratamento durante 7 dias na sensibilidade do barorreflexo espontâneo (a $p<0,01$ vs. sham + veículo; b $p<0,05$ vs. sham + sildenafil; c $p<0,05$ vs. 2R1C + veículo).....	46
Figura 15:	Efeitos do tratamento com sildenafil no tônus autonômico ao coração. Bloqueio com propranolol no ΔFC ($p<0,01$ vs. sham + veículo; b $p<0,01$ vs sham + sildenafil; c $p<0,01$ versus 2R1C + veículo).....	47
Figura 16:	Efeitos do tratamento com sildenafil no tônus autonômico ao coração. Bloqueio com atropina no ΔFC ($p<0,01$ vs. sham + veículo; b $p<0,05$ vs. sham + sildenafil; c $p<0,01$ versus 2R1C + veículo).....	47
Figura 17:	Efeitos do sildenafil sobre o estresse oxidativo em ratos hipertensos. Quantificação de malondialdeído no soro dos diferentes grupos (a $p<0,05$ vs. sham + veículo; b $p<0,01$ vs. sham + sildenafil, c $p<0,01$ vs. 2R1C + veículo)	49
Figura 18:	Esquema representativo das principais observações deste estudo.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Valores de peso corporal e peso dos órgãos nos diferentes grupos.....	42
Tabela 2:	Valores do ganho do barorreflexo espontâneo antes e depois do bloqueio autônômico.....	49
Tabela 3:	Valores de PAM e FC antes das diferentes drogas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ang II	Angiotensina II
CVLM	Bulbo ventrolateral caudal
DC	Débito cardíaco
DCVs	Doenças cardiovasculares
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA 2	Enzima conversora de angiotensina 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FEN	Fenilefrina
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IP	Intraperitonal
MDA	Malondialdeído
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NPS	Nitropussiato de sódio
NTS	Núcleo do trato solitário
NO	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial de pulso
PDE5	Fosfodiesterase-5
PVN	Núcleo paraventricular
RPT	Resistencia periférica total
RVLM	Bulbo ventrolateral rostral
SBRE	Sensibilidade do barorreflexo espontâneo
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
2R1C	Renovascular 2 rins-1 clipe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Hipertensão Arterial	14
1.2 Controle da pressão arterial	15
1.3 Modelo de hipertensão renovascular: sistema renina angiotensina aldosterona ..	19
1.4 Estresse oxidativo e hipertensão	22
1.5 Sildenafil.....	25
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Animais	33
4.2 Indução da hipertensão renovascular	33
4.3 Grupos experimentais	34
4.4 Implantação dos cateteres vasculares	35
4.5 Avaliação do barorreflexo induzido	36
4.6 Avaliação do barorreflexo espontâneo	38
4.7 Avaliação do controle autonômico da frequência cardíaca	38
4.8 Avaliação do estresse oxidativo sistêmico	38
4.9 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Peso corporal e peso dos órgãos.....	41
5.2 O sildenafil reduz a pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular	42
5.3 Sildenafil restaura a sensibilidade do barorreflexo em ratos hipertensos	44
5.4 O tratamento com sildenafil por sete dias restaura desequilíbrio autonômico em ratos hipertensos.....	46
5.5 Tratamento com sildenafil reduziu o estresse oxidativo em ratos hipertensos.....	49
6 DISCUSSÃO discutir sildenafil gmpc e calcioe trabalho de Rubens fazan 2008 e taquicardia uso cronico.....	51

7 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	70

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão Arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) afeta mais de 1,2 bilhão de pessoas no mundo. No Brasil atinge 32,5% (36 milhões) da população adulta e mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doenças cardiovasculares (DCVs) (SCALA; MAGALHÃES; MACHADO, 2012).

A HAS é um dos mais importantes problemas de saúde pública, tendo alta prevalência e baixas taxas de controle. Apresenta-se como o principal fator de risco para o desenvolvimento das DCVs e comorbidades, com alta prevalência e morbidade, acarretando altos custos ao sistema de saúde no Brasil. Está associada a complicações vasculares, doença isquêmica do coração, insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular esquerda, acidente vascular cerebral e doença renal crônica (CHOBANIAN et al, 2003).

Na maioria dos pacientes, a hipertensão não exhibe causa definida, ou seja, são pacientes hipertensos primários ou essenciais. Por outro lado, quando a etiologia da doença é conhecida, tem-se a hipertensão secundária. Esta classificação pode, portanto, direcionar o tratamento de acordo com a etiologia (YE et al, 2000). A HAS é um distúrbio multifatorial e está relacionado, entre outros problemas, à redução na sensibilidade do barorreflexo e à disfunção autonômica (BOTELHO-ONO et al 2011; BRAGA, 2012; GUIMARÃES; CARVALHO; BRAGA, 2012; GRASSI; MARK; ESLER, 2015). Estas características são encontradas numa variedade de modelos animais de hipertensão, tais como o modelo renovascular de hipertensão de Goldblatt (OLIVEIRA-SALES et al, 2008; SOUZA et al, 2008), um dos mais utilizados para o estudo da hipertensão secundária.

A hipertensão renovascular é uma forma de hipertensão arterial onde o fator causal preponderante é isquemia renal (PRAXEDES, 2002), trata-se de uma das causas mais frequentes de hipertensão secundária e está relacionada à hipertensão resistente. Estima-se que entre os hipertensos, 12-15% apresentem hipertensão arterial

resistente (PIMENTA; CALHOUN, 2012). Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia, na hipertensão resistente:

[...] a Pressão Arterial (PA) permanece acima das metas recomendadas com o uso de três fármacos anti-hipertensivos com ações sinérgicas em doses máximas preconizadas e toleradas, sendo um deles preferencialmente um diurético, ou quando em uso de quatro ou mais fármacos anti-hipertensivos, mesmo com a PA controlada (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010, p.576).

O tratamento desses pacientes concentra-se em maximizar as doses de fármacos anti-hipertensivos e a adição de drogas com mecanismos de ação complementares, incluindo uma combinação de inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores do receptor da angiotensina, bloqueadores de canais de cálcio e diuréticos. No entanto, um pequeno, mas importante subgrupo de pacientes permanece com níveis elevados de pressão arterial apesar dos tratamentos combinados com vários medicamentos anti-hipertensivos, ressaltando a necessidade de novas terapias. Nos últimos anos, surgiram novas abordagens terapêuticas incluindo agonistas de peptídeos natriuréticos, cujo segundo mensageiro é o GMPc, antagonistas dos receptores de endotelina e drogas vasoativas adicionais, além das alternativas complementares ao tratamento farmacológico, como por exemplo, a desnervação renal e a ativação do barorreflexo carotídeo (EIRIN et al, 2016).

A hipertensão arterial resistente é um fenômeno de difícil controle clínico associado ao aumento da mortalidade nos pacientes acometidos. Deste modo, o objetivo da utilização de novos tratamentos medicamentosos é a redução do risco cardiovascular, que está diretamente relacionado a alterações vasculares, hipertrofia cardíaca e danos ao sistema nervoso e sistema renal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2012).

1.2 Controle da pressão arterial

Na fisiopatogênese e manutenção da HAS humana e experimental há um desequilíbrio entre influências vasoconstritoras e vasodilatadoras levando a um

aumento da pressão arterial. Muitos mecanismos vasoconstritores clássicos estão envolvidos nesse processo como a ativação do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), e a participação de endotelinas e do hormônio antidiurético (GUYTON et al, 1972; JOHNSTON; FRANZ, 1992; YANAGISAWA et al, 1988; CARVALHO et al, 2012). Estudos recentes implicam também um papel do sistema imunológico no mecanismo da hipertensão (HARRISON et al, 2012). Contudo, tem se destacado as espécies reativas de oxigênio (EROs) na gênese da hipertensão arterial devido a possível atenuação do papel vasodilatador do óxido nítrico (NO), além do fator natriurético atrial, bradicinina e prostaglandinas (CHAMPLAIN et al, 2004; BRAGA et al, 2011).

Fisiologicamente os níveis de PA são controlados de maneira integrada e complexa por ações do sistema cardiovascular, nervoso, renal e endócrino (CHOPRA; BABY; JACOB, 2011). O sistema nervoso central tem um importante papel no controle da PA, por meio do sistema nervoso autonômico. Esse sistema participa da manutenção dos níveis pressóricos regulando dois principais determinantes da PA, ou seja, o débito cardíaco (DC) e a resistência periférica total (RPT), uma vez que $PA = DC \times RPT$.

O sistema nervoso simpático tem uma ação excitatória no coração e nos vasos sanguíneos, enquanto que a inervação parassimpática cardiovagal tem uma ação inibitória sobre o coração. Assim, a atividade equilibrada das eferências do sistema nervoso autonômico é essencial para o controle do sistema cardiovascular a fim de atingir o fluxo de sangue ideal para os órgãos do corpo (VASQUEZ et al, 1997).

Os mecanismos que regulam a PA o fazem através de alterações instantâneas da capacitância venosa e retorno venoso, do débito cardíaco e da resistência periférica, ou de alterações na volemia a longo prazo. A regulação momento a momento da PA é efetuada por mecanismos neurais que corrigem prontamente os desvios dos níveis basais, para mais ou para menos. Dentre aqueles que atuam em curto prazo, destacam-se os reflexos neurais, os quais envolvem barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares. Já os mecanismos de controle ao longo de semanas e

meses fica a cargo da integração do sistema renal-endócrino que equilibram o fluido do corpo e a homeostase do sal com controle da pressão arterial (CHOPRA; BABY; JACOB, 2011).

O reflexo barorreceptor é reconhecido como um dos mecanismos mais importantes para o controle fino da atividade autonômica sobre o sistema cardiovascular. Em respostas a elevações na pressão arterial sistêmica, ocorre bradicardia reflexa, que é mediada pela ativação do sistema nervoso autônomo parassimpático e pela inibição do sistema simpático (GRASSI et al, 1998; SALGADO et al, 2009). A diminuição da eferência simpática para o coração, rins e vasculatura periférica, resulta em inotropismo negativo, assim como cronotropismo e dromotropismo negativo, vasodilatação e redução da secreção de renina. Enquanto o aumento da atividade parassimpática está associado a redução na frequência cardíaca (FC). Ambas as respostas culminam na redução da PA.

Os barorreceptores são receptores sensíveis às alterações mecânicas de pressão e estão dispostos na camada adventícia dos vasos localizados no arco aórtico e bifurcação das carótidas. Os ajustes circulatórios em resposta ao aumento da PA ocorrem porque os barorreceptores despolarizam com maior frequência e impulsos nervosos aferentes provenientes desses receptores convergem para o núcleo do trato solitário (NTS), no sistema nervoso central, via nervo glossofaríngeo e nervo vago. Do NTS, neurônios de segunda ordem projetam-se, por vias excitatórias glutamatérgicas, para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM), que por sua vez inibe o bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Este núcleo, em última instância, controla a atividade simpática por meio da projeção de neurônios pré motores para a coluna intermediolateral. Em paralelo, outro grupo de neurônios glutamatérgicos advindos do NTS exercem influência excitatória sobre neurônios pré-ganglionares parassimpáticos localizados no núcleo dorsal motor do vago e núcleo ambíguo (Figura 1). Desta maneira, a ativação do barorreflexo resulta na inibição simpática e ativação vagal, ao passo que uma resposta inversa é observada quando a PA é reduzida (VASQUEZ et al, 1997).

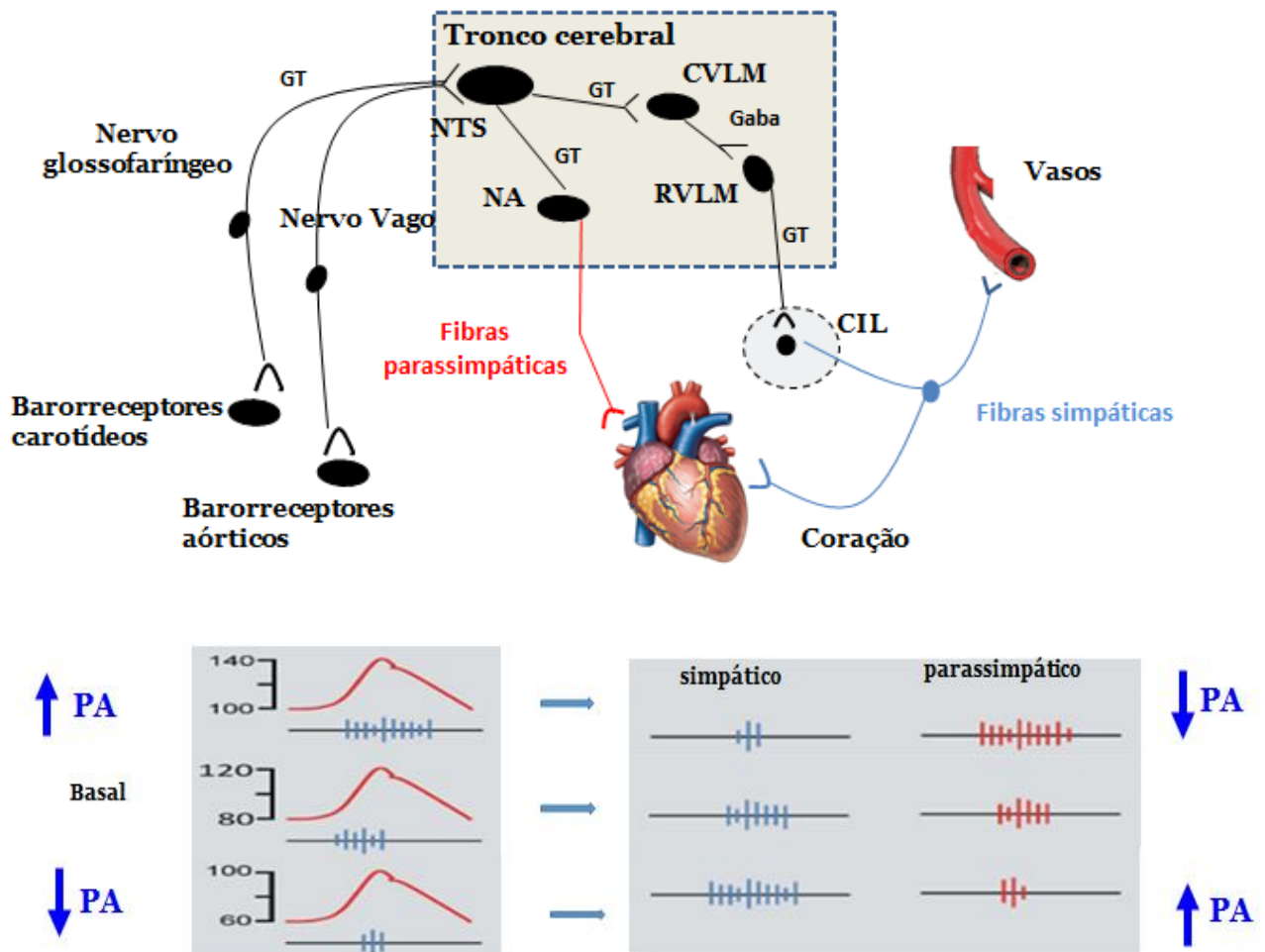


Figura 1: Aferentes e eferentes do barorreflexo. NTS, núcleo do trato solitário; CVLM, bulbo ventrolateral caudal; RVLM, bulbo ventrolateral rostral; CIL, coluna intermédia lateral; NA, núcleo ambíguo. GT, glutamato. Figura adaptada (DONAUGHY; RESTA; WAKER, 2002; VASQUEZ; PEOTTA; MEYRELLES, 2012)

O RVLM também integra entradas do núcleo subfornical (SFO) e do núcleo paraventricular (PVN), proporcionando uma participação importante dessas regiões no controle dos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático (BRAGA et al, 2011). Assim, através da transformação integrativa de áreas centrais, o sistema nervoso simpático e parassimpático fornecem o controle para o sistema cardiovascular e a perfusão ideal de órgãos, de acordo com as suas necessidades metabólicas (CAMPAGNARO et al, 2012).

1.3 Modelo de hipertensão renovascular: sistema renina angiotensina aldosterona

O SRAA é um dos mais importantes reguladores do volume em vertebrados, tendo implicações relevantes no estudo da hipertensão e várias doenças cardiovasculares (CUSHMAN; ONDETTI, 1999). Nos rins, frente a uma redução da pressão de perfusão ou do aporte de cloreto de sódio nas porções tubulares distais, as células justaglomerulares localizadas na parede das arteríolas aferentes, são estimuladas a secretar renina. A secreção de renina se dá por estimulação simpática, alterações da sensibilidade ao estiramento dos mecanorreceptores da arteríola aferente, e pela diminuição de cloreto de sódio no túbulo distal renal, detectado pela mácula densa que emite sinal às células justaglomerulares (HACKENTHAL et al, 1990; SCHNERMANN et al, 1997). A renina é a enzima limitante da velocidade do SRAA, pois converte o angiotensinogênio, produzido no fígado e continuamente presente no sangue, em angiotensina I. Esta por sua vez, é convertida pela enzima conversora da angiotensina (ECA) em angiotensina II (Ang II), que tem ação fisiológica (SOUBRIER et al, 1993; NAVAR et al, 1997). A Ang II causa vasoconstrição, aumenta o tônus simpático, estimula a sede e o apetite ao sal e induz a liberação de vasopressina pela neurohipófise e de aldosterona, pelo córtex adrenal, aumentando a reabsorção de sódio e água. Portanto, as diversas ações da Ang II culminam no aumento da PA (HILL et al, 2012).

A atuação da Ang II ocorre através de duas isoformas de receptores: AT1 e AT2, tendo o último a função moduladora sobre o primeiro. As ações de vasoconstrição, regulação do comportamento de fluidos e sede são atribuídas a ativação dos receptores AT1 e estão relacionados a progressão das doenças cardiovasculares incluindo a hipertensão, aterosclerose, hipertrofia e insuficiência cardíaca (STEGBAUER; COFFMAN, 2011). A Ang II pode ser clivada pela isoforma 2 da enzima conversora da angiotensina (ECA2) em um septapeptídeo chamado angiotensina 1-7, que se liga ao receptor Mas, apresentando respostas contrárias a Ang II (BADER, 2010), conforme representado na Figura 2.

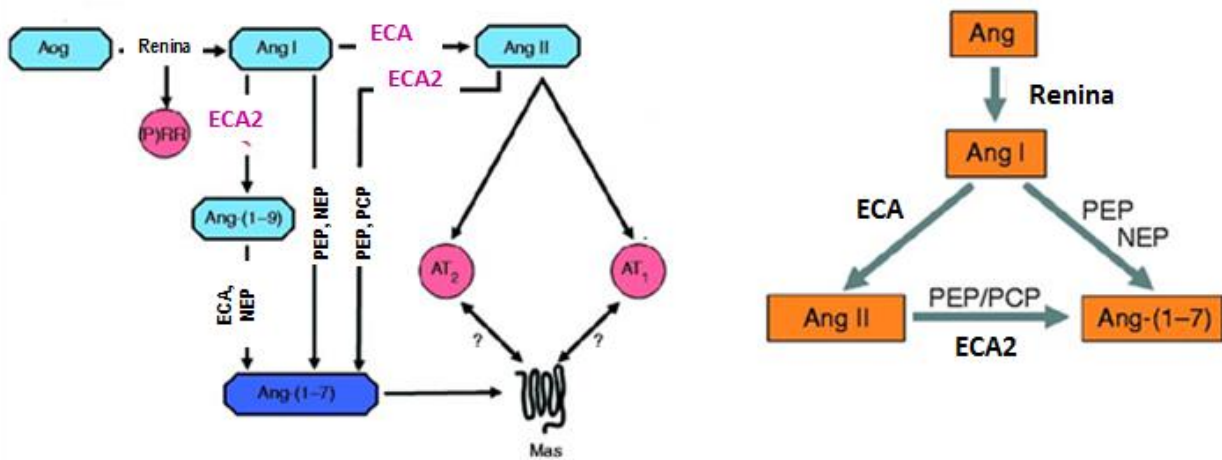


Figura 2: Representação do sistema renina- angiotensina. ECA - enzima conversora de angiotensina, Ang- angiotensina, Aog - angiotensinogenio, AT1- receptor tipo I para Ang II, AT2 - receptor tipo II para Ang II, Mas - receptor Ang-(1-7), PCP – prolilcarboxipeptidase, NEP – endopeptidase neutra, (P)RR – receptor (pro)renina. Figura adaptada (SANTOS et al, 2013).

No modelo experimental de hipertensão renovascular 2 rins um clipe (2R1C) há uma hipertensão induzida pela ativação do sistema renina-angiotensina aldosterona devido a estenose unilateral da artéria renal. Este modelo desencadeia aumento da atividade simpática, redução da atividade parassimpática e disfunção do barorreflexo, que conjuntamente são riscos cardiovasculares importantes (CAMPAGNARO et al, 2012).

A hipertensão renovascular é caracterizada pelo aumento da Ang II, estresse oxidativo e pela disfunção endotelial. A cascata de eventos inicia-se com o aumento da secreção de renina no rim clipado levando ao aumento na Ang II circulante. Além disso, há retenção de sódio, expansão do volume circulante, aumento na produção de aldosterona e na resistência periférica, e finalmente ativação do sistema nervoso simpático e aumento da PA (LERMAN et al, 2005).

Após a estenose arterial renal, aumentos significativos da formação de renina induzem aumento na concentração de Ang II circulante, levando assim a várias alterações mediadas por Ang II como mostrado na Figura 3. O nível de Ang II no rim

sem estenose também aumenta, contudo o aumento não decorre de mecanismos da renina, pois esta se encontra diminuída no rim não clipado (NAVAR et al, 1998).

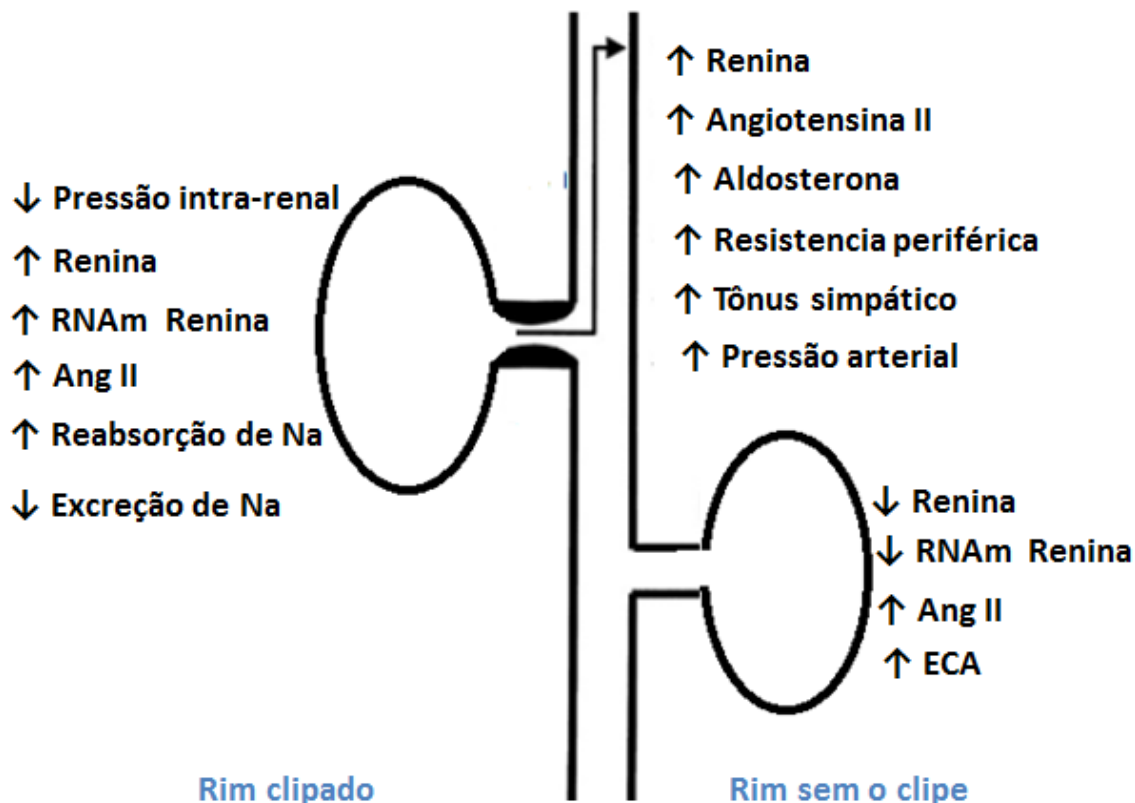


Figura 3: Mecanismos ativados pela estenose unilateral da artéria renal. Figura adaptada (NAVAR et al, 1998).

O clássico SRAA é um sistema complexo de vários peptídeos e vias que tem sido o condutor do desenvolvimento de drogas ao longo dos anos para controlar a hipertensão. No entanto, existem ainda pacientes cuja hipertensão é muito difícil de controlar com medicamentos e estratégias atuais, justificando as pesquisas neste campo (MENDOZA; LAZARTIGUES, 2015).

Atualmente, todos os componentes conhecidos do sistema renina angiotensina foram identificados no cérebro (MARC; LLORENS-CORTES, 2011). Várias evidências sugerem que um mecanismo fundamental pelo qual a Ang II influencia a PA é através da sua capacidade para estimular a produção de espécies reativas de oxigênio

(BRAGA et al, 2008a; GRIENDLING et al, 1994), principalmente ânion superóxido (BERY et al, 2000; ZIMMERMAN et al, 2004).

1.4 Estresse oxidativo e hipertensão

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a quantidade de EROs formada e a quantidade metabolizada ou eliminada. São geralmente produzidas a partir da respiração celular e processos metabólicos como subprodutos através da ativação de enzimas, tais como xantina oxidase, desacoplamento da enzima sintase de óxido nítrico e enzimas mitocondriais respiratórias. Outras fontes de EROs provêm das oxidases de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase) (TOUYZ et al, 2011; GEISZT, 2006; SESHIAH et al, 2002). As espécies reativas de oxigênio regulam processos celulares, tais como a diferenciação, proliferação, apoptose, ciclo celular, a migração, a secreção, a organização do citoesqueleto, a ativação de fatores de transcrição, e a expressão de genes. No sistema vascular, desempenham um papel fisiológico no controle da função endotelial e tônus vascular e um papel fisiopatológico em processos subjacentes a disfunção endotelial, a hiper-reatividade, inflamação, e a remodelação vascular em doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão (AL GHOULEH et al 2011).

Em situações patológicas há um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes, resultando no fenômeno conhecido como estresse oxidativo (TOUYZ, 2004). Este fenômeno está entre as possíveis causas para o desenvolvimento da hipertensão, devido principalmente, ao aumento da produção de EROs, que incluem: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2); diminuição dos níveis de NO; e redução da capacidade antioxidante do sistema cardiovascular, renal, e sistema nervoso central (MONTEZANO; TOUYZ, 2012). Um exemplo do desequilíbrio dos radicais livres consiste na reação do $O_2^{\cdot-}$ com o NO formando peroxinitrito ($ONOO^-$), diminuindo a biodisponibilidade do NO e suas ações benéficas cardiovasculares (PACHER et al, 2007).

Os mecanismos exatos pelos quais as EROs influenciam a pressão arterial permanecem obscuros, mas muitos sistemas estão envolvidos, incluindo o cérebro, coração, rins e vasos. Dentre as possíveis causas para o desenvolvimento da hipertensão, destaca-se o estresse oxidativo, pois o desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode alterar o funcionamento das áreas centrais de controle da PA (BRAGA; COLOMBARI; JOVITA, 2011; BRAGA et al, 2011; BOTELHO-ONO et al, 2011; QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013). A principal fonte de EROs no sistema cardiovascular-renal é a família da NADPH oxidase (TOUYZ et al, 2011). Quando desregulada, a NADPH oxidase desempenha um papel no aumento da produção de EROs, que leva à disfunção endotelial e remodelação vascular na hipertensão (MONTEZANO; TOUYZ, 2014).

O aumento de superóxido gera mudanças em canais iônicos, especialmente canais cálcio e potássio, alterando as propriedades de disparo neuronal em áreas do cérebro, tais como o RVLM, resultando em aumento da atividade nervosa simpática e aumento na PA (BRAGA et al, 2011). Vários estudos tem revelado que o aumento das EROs gerado pela enzima NADPH oxidase, decorrente da ativação de receptor AT1, é o mecanismo fundamental envolvido na hipertensão derivada de Ang II (QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013).

A Ang II é o principal efector do SRAA e atua a nível periférico e central. Como se trata de uma substância que dificilmente atravessa a barreira hematoencefálica, a hipótese mais aceita é que a Ang II atue nos órgãos circunventriculares, regiões do sistema nervoso central desprovidas de barreira hematoencefálica. Os neurônios do órgão subfornical, área importante entre os órgãos circunventriculares, são ativados por Ang II e comunicam-se com o PVN e o RVLM modulando a atividade simpática, pois ocorre a estimulação da produção local de Ang II em outras áreas do cérebro protegidas pela barreira hematoencefálica (PHILIPS; SUMNERS, 1998; BRAGA et al, 2011; BRAGA, 2012). Outra hipótese da ação da Ang II em áreas centrais diz respeito à maior permeabilidade da barreira em certas patologias. Estudos com corantes fluorescentes intravasculares e imuno-histoquímica revelaram aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica em ratos hipertensos em regiões como

PVN, NTS e RVLM, regiões críticas do cérebro conhecidas por contribuir para a ativação neuro-humoral durante a hipertensão (BIANCARDI et al, 2014).

O estresse oxidativo atua em nível periférico e central desempenhando um papel importante em seres humanos com hipertensão renovascular e hipertensão essencial (QUEIROZ et al, 2012). O envolvimento do estresse oxidativo na patologia da hipertensão arterial foi relatado em vários modelos animais, incluindo o modelo 2R1C (OLIVEIRA-SALES et al., 2008; BOTELHO-ONO et al, 2011; NISHI et al, 2010). Neste modelo o SRAA desempenha um papel importante no controle da pressão, pois se trata de um modelo dependente de Ang II, caracterizado pela disfunção do barorreflexo e aumento da atividade simpática. A Ang II estimula a geração de ânion superóxido por aumento da atividade da NADPH oxidase. Em nível central, EROs estão envolvidas na sinalização neuronal, contribuindo para simpatoexcitação e hipertensão (OLIVEIRA-SALES et al, 2008). Estudos mostraram que o modelo de hipertensão 2R1C apresenta níveis aumentados de superóxido, aumento dos receptores AT1 para Ang II e maior expressão do gene da NADPH oxidase (subunidades p47phox e gp91phox) no PVN. Além disso, sabe-se que a microinjeção de tempol, um mimético da enzima superóxido dismutase (enzima antioxidante), ou vitamina C no PVN reduz a pressão sanguínea e atividade simpática de ratos com hipertensão renovascular (OLIVEIRA SALES et al, 2009; OLIVEIRA SALES et al, 2010).

O estresse oxidativo está relacionado a uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e este constitui uma molécula-chave de sinalização no sistema cardiovascular e no sistema nervoso, além de desempenhar um papel na defesa do hospedeiro. PerifERICAMENTE o NO atua como um fator de relaxamento derivado do endotélio e centralmente exerce papel modulatório sobre a atividade simpática. No RVLM foi descrito que o NO é capaz de aumentar a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA), reduzindo a atividade simpática (KISHI; HIROOKA, 2012). A redução da atividade simpática após o uso de bloqueadores de receptor AT1 parece estar envolvida não apenas na redução do estresse oxidativo, mas também no aumento da sinalização mediada por NO (KISHI, 2013).

Neste contexto, destaca-se o potencial de substâncias antioxidantes no tratamento da hipertensão, já que estas substâncias reduzem as EROs e melhoram a biodisponibilidade de NO, diminuindo o efeito pressor. Trabalhos recentes de nosso grupo demonstraram que o tratamento com antioxidantes é capaz de reverter o quadro de estresse oxidativo e perda da sensibilidade do barorreflexo (DIAS et al, 2014b; GUIMARÃES et al, 2012; MONTEIRO et al, 2012; MENDES-JÚNIOR et al, 2013). Corroborando com estes achados Nishi e colaboradores (2010) demonstram que antioxidantes reduzem a atividade simpática renal.

1.5 Sildenafil

Entre as substâncias antioxidantes, o citrato de sildenafil se apresenta como promissora alternativa terapêutica. É um fármaco comprovadamente seguro amplamente utilizado para a disfunção erétil, não se limitando a esta ação (SCHWARTZ et al, 2012). Foi desenvolvido pela Pfizer, e em março de 1998, foi o primeiro inibidor da fosfodiesterase-5 (PDE-5) aprovado pelos Estados Unidos *Food and Drug Administration* para o tratamento da disfunção erétil. Atualmente aprovado também para o tratamento de hipertensão pulmonar (KUKREJA et al, 2011).

O sildenafil é um inibidor seletivo da PDE5, uma enzima que catalisa a degradação hidrolítica do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), mensageiro intracelular essencial na modulação de diversos processos biológicos em células vivas. Foram identificadas um total de 11 famílias de fosfodiesterases com distribuição entre os diferentes tipos de células e tecidos a depender da isoforma, e muito provavelmente entre diferentes compartimentos celulares (BENDER; BEAVO, 2006). Outra diferença importante entre as isoformas de fosfodiesterase é a sua especificidade de substrato para AMPc ou GMPc. A PDE-5, por sua vez, foi originalmente identificada em 1980, tem especificidade para o GMPc, e está amplamente presente no músculo liso dos brônquios, plaquetas, túbulos renais, tecidos pulmonares (KUKREJA et al, 2011) e cardiomiócitos (DAS; XI; KUKREJA, 2005).

O citrato de sildenafil melhora os níveis pressóricos em pacientes com hipertensão resistente (OLIVER, 2010; QUINAGLIA, 2013). Um número crescente de estudos revelaram um papel cardioprotetor contra lesão miocárdica (OCKAILI et al, 2002; ROSANIO et al, 2006), hipertrofia cardíaca (TAKIMOTO et al, 2005) e insuficiência cardíaca (WESRERMANN et al, 2012). Seus efeitos cardiovasculares devem-se à melhora da sinalização do NO por aumento de seu segundo mensageiro intracelular, o GMPc (BALARINI et al, 2013; RAJA; NAYAK, 2004.). O GMPc promove ativação da proteína kinase G, o que leva à redução do conteúdo intracelular de cálcio, com consequente vasodilatação (MONCADA; HIGGS, 1993) (Figura 4).

Tem sido demonstrado ainda, que o aumento de GMPc pode inibir a expressão e atividade da NADPH oxidase, reduzindo a produção de ânion superóxido (KOUPPARIS et al, 2005). Esta atuação do sildenafil na redução de EROs é importante visto que em estudo com células de cultura os ânion superóxido podem causar alterações no sistema de transdução de sinal celular por aumento da produção de trifosfato de inositol e diminuição de GMPc favorecendo a vasoconstrição (CHAMPLAN, et al, 2004).

A vantagem potencial de uma abordagem terapêutica baseada na inibição da PDE5 ao invés da doação direta de NO é a redução dos riscos citotóxicos do excesso de NO (VERTUANI; MANFREDINI, 2004). Desta maneira, e considerando a carência de dados da literatura, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento com citrato de sildenafil sobre o controle central da PA (barorreflexo). Nossa hipótese é que o tratamento irá restabelecer a sensibilidade do controle barorreflexo da PA por correção do desequilíbrio autonômico e diminuição dos níveis de EROs nos animais com hipertensão renovascular.

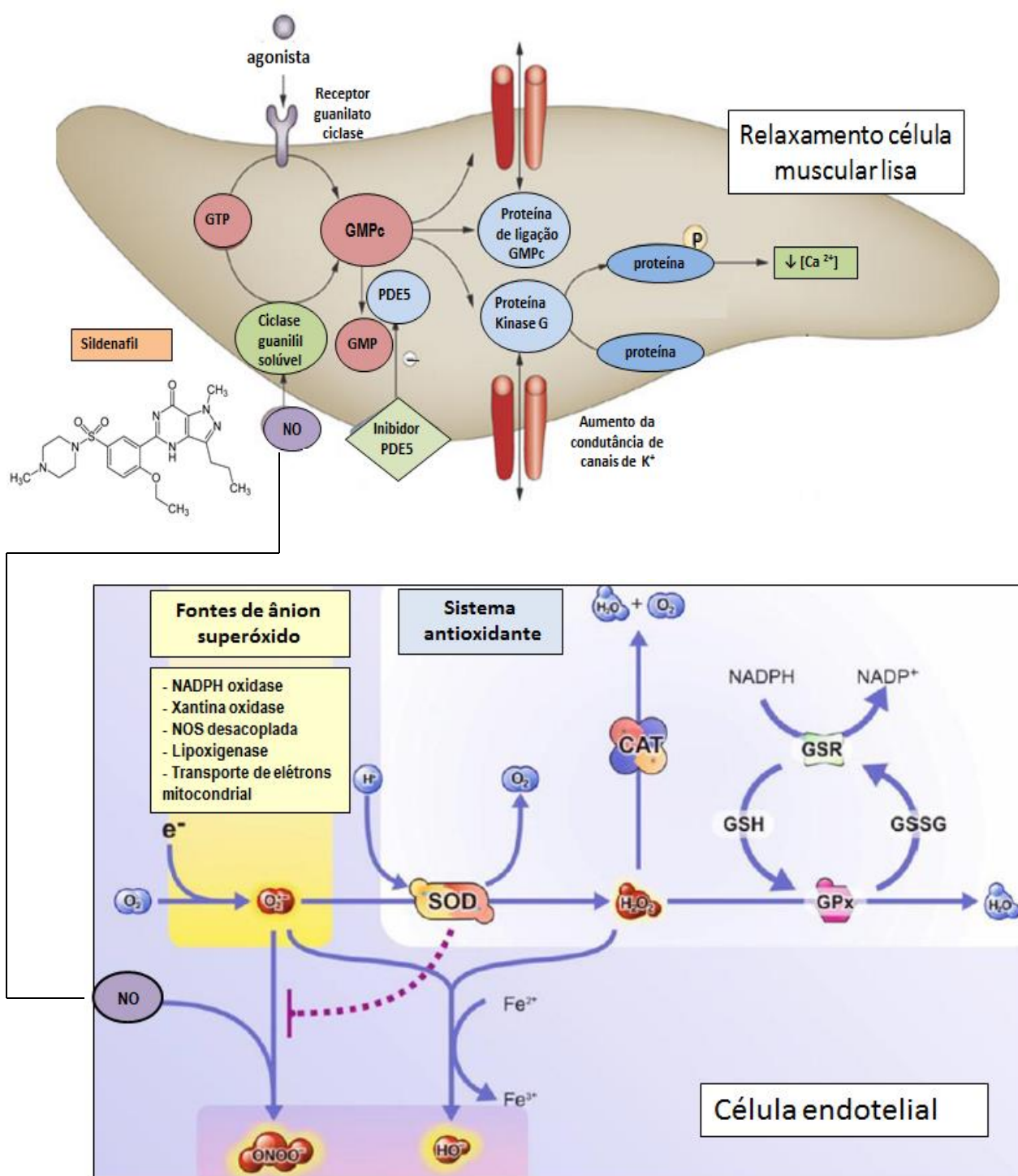


Figura 4: Mecanismo de ação de inibidores da PDE5. Figura adaptada (GHOFRANI, H. A; OSTERLOH, I. H; GRIMMINGER, 2006).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial é importante fator de risco ao desenvolvimento das DCVs e sua prevalência na população brasileira é alta. Deste modo, é fundamental para o Sistema Único de Saúde brasileiro a execução de projetos de pesquisa que visem apontar novas formas de controle e tratamento da hipertensão arterial. O desenvolvimento de novos fármacos é dispendioso e demorado, de forma que novos ensaios pré-clínico com medicamentos que já são utilizados na prática clínica com outras finalidades tornam-se de grande relevância.

Recentemente, foram demonstrados os efeitos benéficos do tratamento com sildenafil sobre os altos níveis de Ang II e EROs e sobre a PA em camundongos hipertensos (DIAS et al, 2014b). Também foram vistos efeitos favoráveis do tratamento crônico com sildenafil na disfunção endotelial e na aterosclerose em modelo de hipercolesterolemia espontânea (BALARINI et al, 2013). No entanto, nenhum estudo anterior avaliou os efeitos da administração crônica do citrato de sildenafil sobre o controle central da PA (barorreflexo) e sobre os níveis de EROs em modelos de ratos com hipertensão renovascular.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do tratamento crônico com citrato de sildenafil sobre o controle central barorreflexo da pressão arterial em modelo experimental de hipertensão reovascular em rato.

3.2 Objetivos Específicos

Abordagens *in vivo*

Avaliar, nos ratos com hipertensão renovascular, os efeitos do tratamento por sete dias com citrato de sildenafil:

- nos parâmetros hemodinâmicos (PA e FC);
- na sensibilidade do barorreflexo espontâneo e induzido farmacologicamente;
- no balanço entre os tônus simpático e parassimpático.

Abordagens *in vitro*

Avaliar, em amostra de soro dos ratos com hipertensão renovascular, os efeitos do tratamento por sete dias com citrato de sildenafil no estresse oxidativo sistêmico.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Utilizamos quarenta e três ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, provenientes do Biotério Professor Thomas George do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pesando 150 - 200g. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro 12/12h) com acesso à água e ração (Labina®, Purina, SP, Brasil) *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba sob o parecer 042/2015 (Anexo).

4.2 Indução da hipertensão renovascular

A cirurgia de indução da hipertensão renovascular consiste na obstrução parcial do fluxo sanguíneo para os rins. Para realização desta cirurgia os ratos foram anestesiados com uma mistura de cetamina (75mg/Kg) e xilazina (10mg/kg) via intraperitoneal (IP). O nível da anestesia foi checado por reflexos de retirada do membro e doses de 0,1 mL foram administradas IP, conforme necessário. Após anestesia, os animais foram submetidos a uma laparotomia mediana, identificação da veia e a artéria renal direita, separação cuidadosa da artéria renal e inserção de um clipe de prata em formato de U com 0,2 mm de abertura. Os animais controle (sham) sofreram o mesmo procedimento cirúrgico, sem a inserção do clipe de prata. Após a cirurgia os animais foram alocados em gaiolas individuais para recuperação e mantidos em observação em ambiente com iluminação, temperatura e ruído controlados, com acesso à água e ração *ad libitum*. Neste modelo o clipe reduz o fluxo sanguíneo renal significativamente, diminuindo a taxa de filtração glomerular e aumentando assim a secreção de renina, condição necessária para o desenvolvimento da hipertensão (GOLDBLATT, et al, 1934; NAVAR, et al, 1998).

4.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos diferentes:

- 1) Sham + veículo (n = 9): animais submetidos a cirurgia sham que receberam veículo (água destilada) durante 7 dias via gavagem;
- 2) Sham + sildenafil (n = 7): animais submetidos a cirurgia sham e tratados com citrato de sildenafil durante 7 dias (45mg/kg/dia) via gavagem;
- 3) 2R1C + veículo (n = 11): animais submetidos a cirurgia de indução da hipertensão renovascular que receberam o veículo durante 7 dias via gavagem;
- 4) 2R1C + sildenafil (n = 11): submetidos a cirurgia de indução da hipertensão renovascular e tratados com citrato de sildenafil durante 7 dias (45mg/kg/dia) via gavagem.

Após a quinta semana da cirurgia de indução da hipertensão renovascular ou sham os animais foram tratados com sildenafil (45mg/kg/dia) ou veículo via gavagem por sete dias. O volume administrado seguiu o seguinte cálculo: $(\text{peso do animal} \times 9) / 4000$ a partir de uma solução de 20mg/ml. A dose do sildenafil foi escolhida com base em estudos anteriores e na diferença da farmacocinética do sildenafil em diferentes espécies (GUIMARÃES et al, 2013; FERREIRA-MELO et al, 2006; WALKER et al, 1999). Foi obtido por meio da trituração de comprimidos (Viagra/ Pfizer) que foram suspensos em água destilada e a suspensão homogeneizada no momento da administração, por gavagem. A agulha utilizada na gavagem foi adequada para uso em roedores possuindo proteção que impede lesão à região orofaríngea do animal.

Após o tratamento com o sildenafil, os animais foram submetidos à cateterização da veia e artéria femoral para registros hemodinâmicos. Posteriormente o sangue dos animais foi recolhido por meio do cateter arterial para a avaliação do estresse oxidativo sistêmico. E por fim, os animais foram eutanasiados por decapitação e os órgãos removidos (Figura 5).

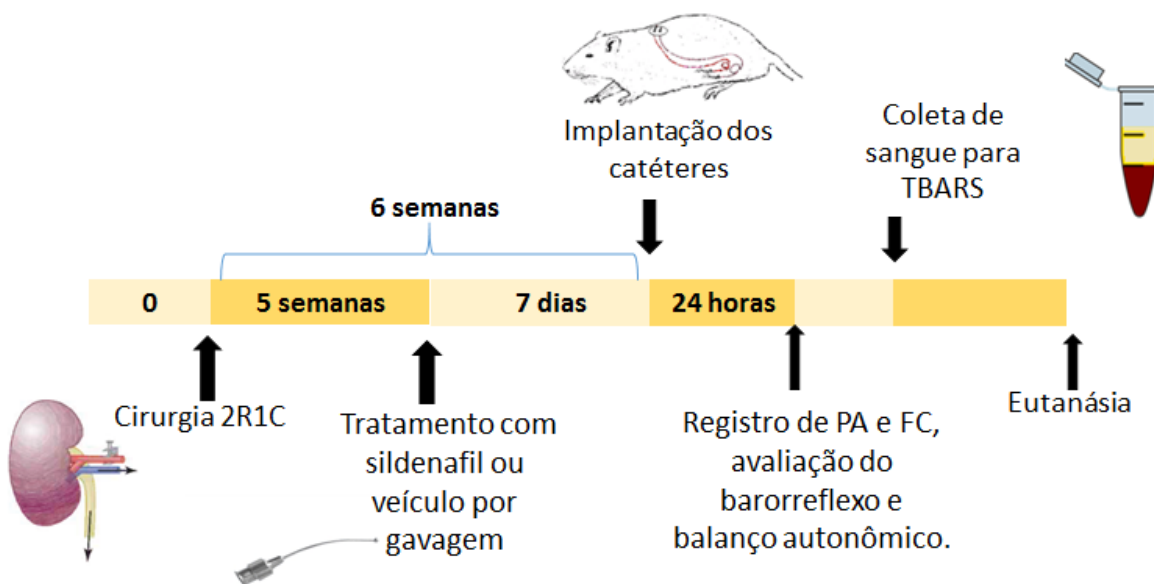


Figura 5: Ilustração temporal e de eventos realizados durante o procedimento experimental

4.4 Implantação dos cateteres vasculares

No último dia de tratamento com sildenafil os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (75mg/Kg) e xilazina (10mg/kg) IP para a implantação de cateteres de polietileno PE-10 (diâmetro interno de 0,28 mm e externo de 0,61 mm) de 4 cm para artéria e 2,5 cm para veia, contínuos a cateteres PE-50 (diâmetro interno de 0,58 mm e externo de 0,96 mm) de 20 cm. Os cateteres foram previamente preenchidos com solução salina a 0,9% + 500UI de heparina e a extremidade PE-50 foi obstruída com pino de metal.

Após anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal e, por meio de uma pequena incisão na região inguinal, a aorta abdominal e veia cava inferior foram cateterizadas via artéria e veia femoral, respectivamente (Figura 6). Os cateteres foram fixados e exteriorizados na região cervical posterior do animal. Após o procedimento cirúrgico os animais foram alocados em gaiolas individuais para recuperação e mantidos em observação em ambiente com iluminação, temperatura e ruído controlados. Durante a recuperação, tiveram acesso à água e ração *ad libitum*.



Figura 6: Representação esquemática dos vasos onde foram implantados os cateteres para o registro dos parâmetros cardiovasculares e administração de drogas.

Foram avaliados a pressão arterial e frequência cardíaca, a função barorreflexa e autonômica na maioria dos animais de cada grupo, incluindo aqueles utilizados para a representação típica dos traçados basais. Em primeiro lugar, a linha de base PA e FC foram registradas por 40 minutos. Para os estudos da função do barorreflexo induzido por drogas, utilizamos fenilefrina (FEN) e nitroprussiato de sódio (NTS), administrados aleatoriamente com intervalo de aproximadamente 15 minutos entre as doses, a fim de garantir que os parâmetros cardiovasculares voltassem aos valores basais. Por último, o propranolol e atropina foram administrados aleatoriamente com 3 horas de intervalo entre as doses.

4.5 Avaliação do barorreflexo induzido

Conforme adaptação do protocolo descrito por Botelho-Ono e colaboradores (2011), após a recuperação os parâmetros hemodinâmicos foram aferidos nos animais não anestesiados pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (Modelo BRPL2, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) acoplado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW,

Australia) com o software LabChart 5.0 (ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia), ilustrado na Figura 7. O cateter venoso foi utilizado para a administração de drogas. Após 40 minutos de estabilização, foram aferidos os valores de pressão arterial sistólica e diastólica (PAS e PAD, respectivamente), dos quais derivamos os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A sensibilidade do barorreflexo induzido foi avaliada por meio da avaliação do ganho do sistema, isto é, da relação entre a variação de FC e a variação de PAM ($\text{Ganho} = \Delta\text{FC}/\Delta\text{PAM}$). Variações na pressão arterial foram alcançadas por meio da administração *in bolus* de drogas vasoativas. A fenilefrina [8 µg/ml], agonista alfa adrenérgico, na dose 8 µg/Kg e o nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico [25 µg/ml], na dose 25 µg/Kg. Estas drogas foram administradas aleatoriamente com intervalo de 15 minutos, a fim de garantir que os parâmetros cardiovasculares voltassem aos valores basais e o ΔPAM causados pela administração das mesmas foram iguais para os grupos.



Figura 7: Equipamento utilizado para medida de PA e FC.

4.6 Avaliação do barorreflexo espontâneo

Foram avaliados também a sensibilidade do barorreflexo espontâneo (SBRE), como previamente descrito (BRAGA et al, 2008; FAZAN et al, 2008). Uma sequência barorreflexo foi definida como uma sequência de pelo menos quatro batidas do coração em que ambos pressão arterial sistólica e intervalo de pulso estavam aumentados (sequências altas, *high sequences*) ou diminuídos (sequências baixas, *low sequences*). O ganho da resposta barorreflexo foi calculada e expressa em batimentos por minuto / mmHg. Traçados foram analisados usando o software HeMoLab (gentilmente fornecida pelo Dr. Harald Stauss, Universidade de Iowa, versão 9.3).

4.7 Avaliação do controle autonômico da frequência cardíaca

A função autonômica foi avaliada em animais conscientes (BOTELHO-ONO et al, 2011; XIA et al, 2013). O bloqueio autonômico foi realizado para avaliar a contribuição do sistema nervoso simpático e parassimpático no controle da frequência cardíaca. As alterações no ritmo cardíaco após a injeção de propranolol [5 mg/ml] (β -bloqueador, 5 mg/kg intravenoso) ou atropina [4 mg/ml] (bloqueador do receptor muscarínico, 4 mg/kg intravenoso) foram calculados e expressos como ΔFC . Variação da pressão arterial média (ΔPAM) também foi medida. Cada administração da droga foi escolhida aleatoriamente e separadas uma da outra por um intervalo de, pelo menos, 3 h, no mesmo dia. O primeiro bloqueio autonômico foi realizado após o retorno aos valores basais da PAM e FC após o teste do barorreflexo (15 min).

4.8 Avaliação do estresse oxidativo sistêmico

O sangue colhido pelo cateter arterial foi centrifugado em 5000 rpm, 4°C, por 10 minutos. O soro foi utilizado para a quantificação de malondialdeído (MDA), o produto final da peroxidação de lipídios. A reação entre MDA e ácido tiobarbitúrico (TBA) produz um complexo de cor vermelha que apresenta pico de absorbância a 532 nm. Uma

amostra de 0,25 mL de soro foi adicionada a 0,4 mL de ácido perclórico 35% e centrifugada a 598 g (14000 rpm) por 20 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado 0,4 mL de ácido tiobarbitúrico 0,06% e levado ao banho-maria a 60°C durante 1 hora. Após arrefecer, a absorbância foi mensurada no equipamento de análise bioquímica Chem Well T (Figura 8) em um comprimento de onda de 532 nm. Uma curva padrão de MDA foi construída com concentrações entre 0 e 100 nmol/ml antes da leitura das amostras.



Figura 8: Equipamento de análise bioquímica Chem Well

4.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Foi realizado teste *t* de Student ou a análise de variância de uma ou duas vias de acordo com o experimento, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 95%, $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Peso corporal e peso dos órgãos

Em relação ao peso dos animais, a Tabela 1 mostra que os animais do grupo sham + sildenafil estavam menores que os demais grupos, por isso, foi avaliada a relação peso dos órgãos por peso corporal nos diferentes grupos. Os rins clipados de ambos os grupos com hipertensão renovascular mostraram atrofia, demonstrada pela redução da relação rim direito/peso corporal quando comparada com os grupos sham e com a relação rim esquerdo/peso corporal do mesmo grupo. Nenhuma diferença foi observada na relação peso do rim esquerdo/peso corporal, nem na relação peso coração/peso corporal relativamente à indução de hipertensão ou tratamento com sildenafil. O peso absoluto dos órgãos também foi fornecido nessa tabela.

Tabela 1: Valores de peso corporal e peso dos órgãos nos diferentes grupos

	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)	Rim direito/peso corporal (mg/g)	Rim esquerdo/peso corporal (mg/g)	Coração/peso corporal (mg/g)	Rim direito (g)	Rim esquerdo (g)	Coração (g)
Sham + Veículo	173,8±3,7	289,7±13,8	4,4±0,14	4,2±0,17	3,7±0,16	1,3±0,04	1,2±0,05	1,1±0,07
Sham + Sildenafil	157,1±1,2 ^a	201,7±12,6 ^a	4,3±0,2	4,3±0,23	4,2±0,28	0,85±0,04 ^d	0,9±0,05 ^a	0,83±0,05 ^d
2R1C + Veículo	174,0±2,8	272,8±13,4	2,6±0,3 ^{b,c}	4,3±0,31	4,1±0,22	0,74±0,12 ^c	1,1±0,05	1,1±0,05
2R1C + Sildenafil	175,8±4,2	283,3±7,6	2,5±0,4 ^{b,c}	4,4±0,31	3,6±0,21	0,70±0,13 ^c	1,2±0,08	1,0±0,05

Os valores foram comparados por Teste T

^a p < 0,01 vs todos os outros grupos

^b p < 0,01 vs ambos grupos sham

^c p < 0,05 vs lado esquerdo do mesmo grupo

^d p < 0,05 vs sham + veículo

5.2 O sildenafil reduz a pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular

A Figura 9 mostra os traçados representativos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um animal de cada grupo estudado (sham + veículo, sham + sildenafil, 2R1C + veículo e 2R1C + sildenafil).

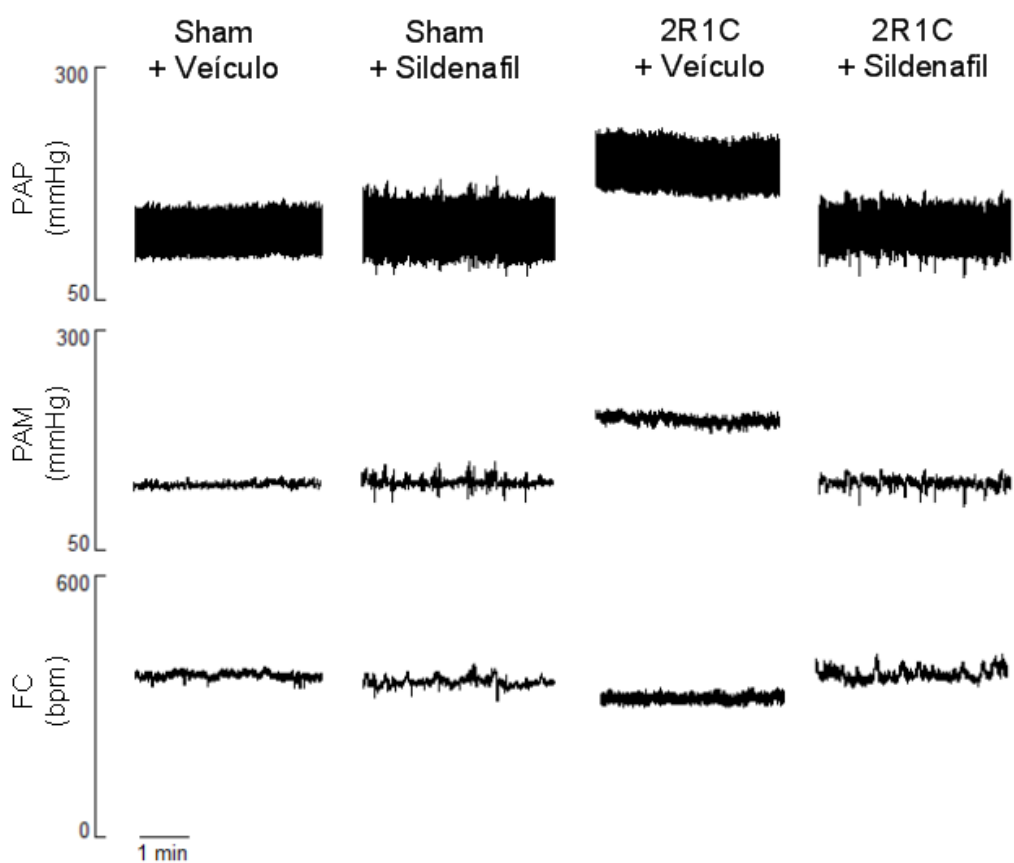


Figura 9: Traçados representativos de um animal de cada grupo mostrando a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Como esperado, a pressão arterial média estava aumentada em animais 2R1C + veículo quando comparados com o grupo sham + veículo (175 ± 6 vs. 118 ± 3 mmHg, $p < 0,01$). O tratamento dos animais 2R1C com sildenafil por sete dias reduziu a PAM quando comparados com os animais hipertensos não tratados (139 ± 5 vs. 175 ± 6 mmHg, $p < 0,01$).

mmHg, $p < 0,01$). Também observamos que a administração de sildenafil nos animais sham não modificou significativamente PAM (121 ± 7 vs. 118 ± 3 mmHg) (Figura 10).

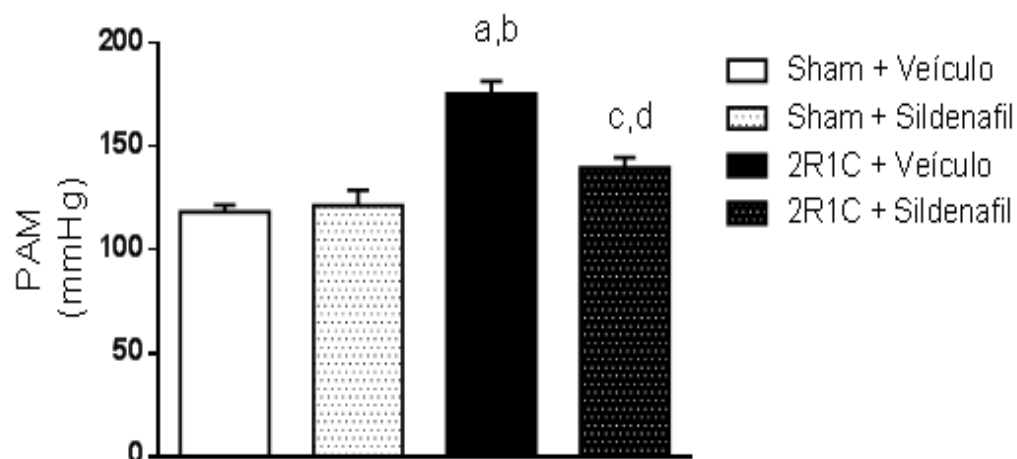


Figura 10: Efeito do tratamento com sildenafil durante 7 dias sobre a pressão arterial média (PAM) dos grupos experimentais. a $p < 0,01$ vs. sham + veículo; b $p < 0,01$ vs. sham + sildenafil; c $p < 0,05$ vs. sham + veículo; d $p < 0,01$ vs. 2R1C + veículo. ANOVA de uma via.

A figura 11 mostra os efeitos do tratamento com sildenafil sobre a frequência cardíaca, demonstrando que não houve diferença significativa entre os quatro grupos experimentais.

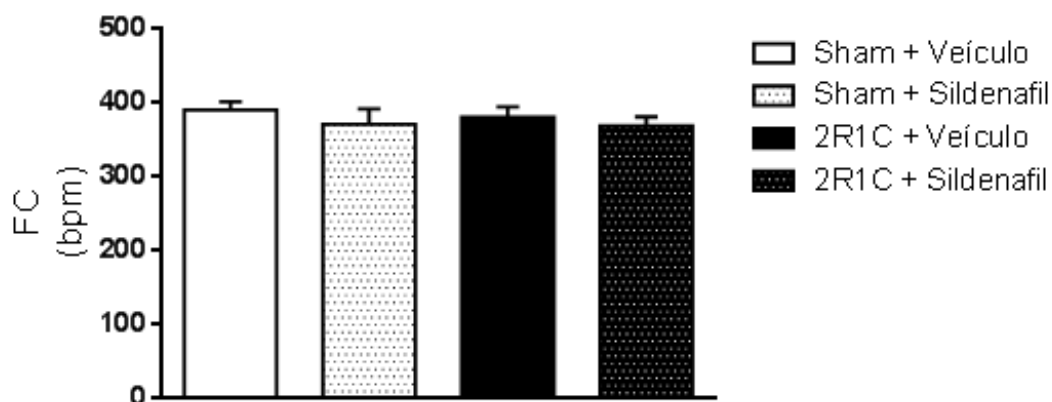


Figura 11: Efeito do tratamento com sildenafil durante 7 dias sobre a frequência cardíaca (FC) dos grupos experimentais. ANOVA de uma via.

5.3 Sildenafil restaura a sensibilidade do barorreflexo em ratos hipertensos

A Figura 12 mostra um traçado representativo de cada grupo com as alterações na pressão arterial e frequência cardíaca após a administração de drogas vasoativas durante o teste do barorreflexo (FEN, 8 µg/Kg e NTP, 25 µg/Kg).

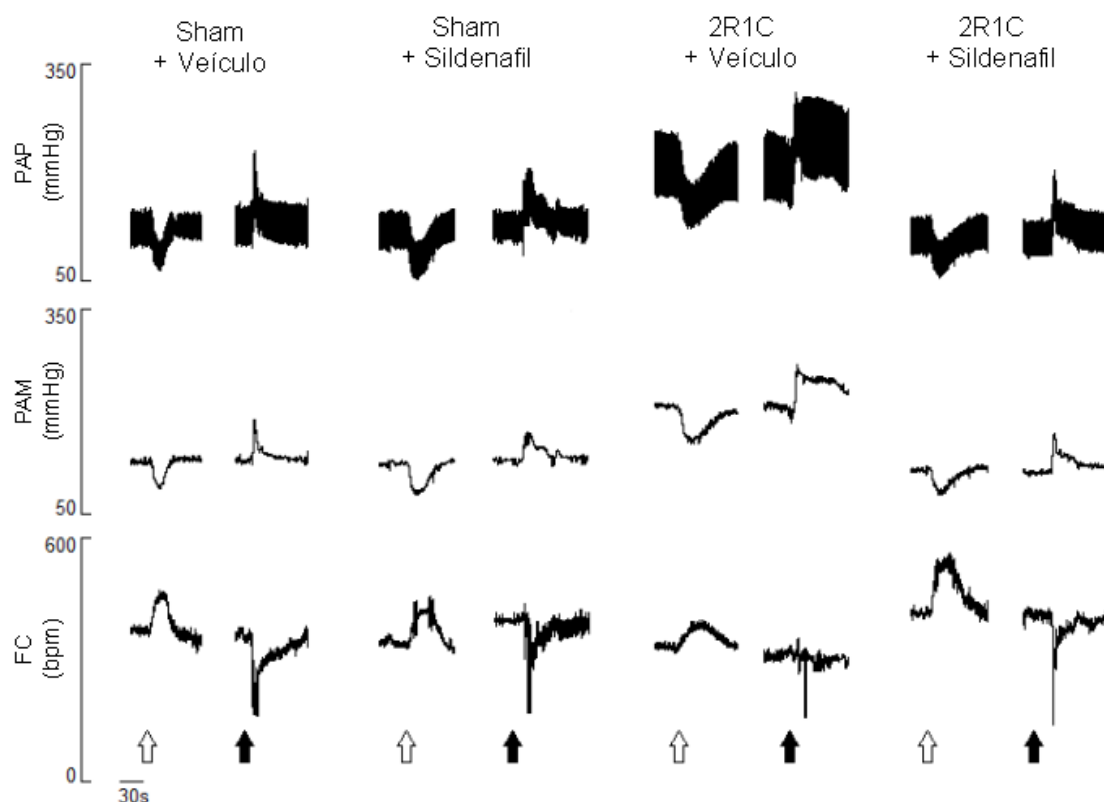


Figura 12: Traçados representativos de um animal de cada grupo mostrando alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC) em resposta ao nitroprusiato de sódio (setas brancas) e fenilefrina (setas pretas).

A Figura 13 mostra o ganho do barorreflexo induzido farmacologicamente nos diferentes grupos. Os animais hipertensos tratados com veículo apresentaram uma redução no ganho do barorreflexo quando comparados com os ratos sham + veículo (respectivamente $-1,93 \pm 0,12$ vs. $-3,63 \pm 0,31$ bpm/mmHg, $p < 0,01$). O tratamento dos

ratos hipertensos com sildenafil por sete dias foi eficiente em melhorar o ganho do barorreflexo ($-3,18 \pm 0,23$ vs. $-1,93 \pm 0,12$ bpm/mmHg, $p < 0,01$).

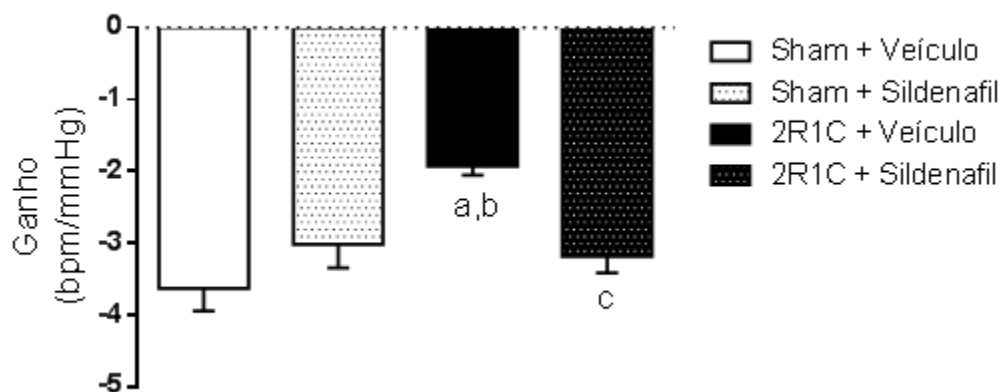


Figura 13: Efeito do tratamento com sildenafil durante 7 dias na sensibilidade do barorreflexo ativado farmacologicamente (a $p < 0,01$ vs. sham + veículo; b $p < 0,05$ vs. sham + sildenafil; c $p < 0,01$ versus 2R1C + veículo). ANOVA de uma via.

Os resultados do barorreflexo espontâneo foram similares ao barorreflexo ativado farmacologicamente (Figura 14). Observou-se que os ratos hipertensos apresentaram uma sensibilidade do barorreflexo reduzida quando comparada com animais sham + veículo ($-1,90 \pm 0,22$ vs. $-3,95 \pm 0,46$ bpm/mmHg, $p < 0,01$) e o tratamento com sildenafil por sete dias restaurou a sensibilidade do barorreflexo espontâneo ($-3,51 \pm 0,29$ bpm/mmHg vs. 2R1C + veículo, $p < 0,05$).

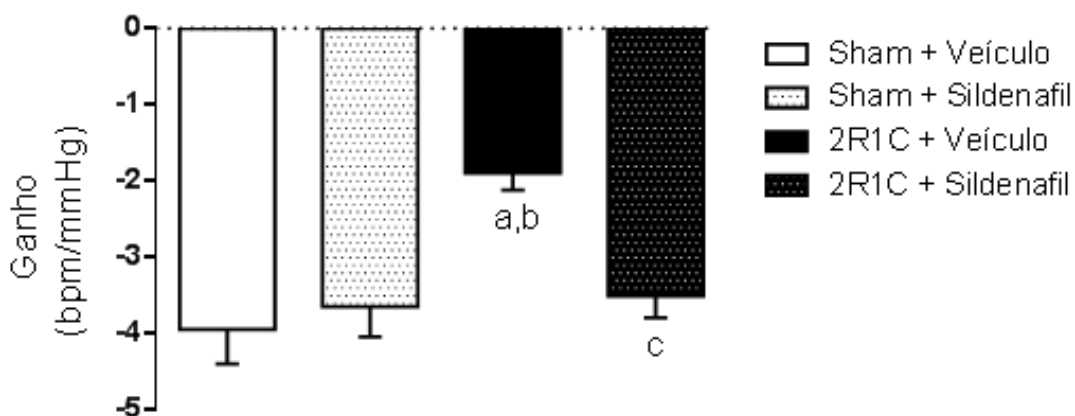


Figura 14: Efeito do tratamento durante 7 dias na sensibilidade do barorreflexo espontâneo (a $p < 0,01$ vs. sham + veículo; b $p < 0,05$ vs. sham + sildenafil; c $p < 0,05$ vs. 2R1C + veículo). ANOVA de uma via.

A avaliação do barorreflexo em ambos os casos, espontâneo ou ativado por drogas vasoativas, revelou que o tratamento de ratos normotensos com sildenafil não modificou a sensibilidade do barorreflexo neste grupo ($-3,65 \pm 0,40$ e $-3,01 \pm 0,33$ bpm/mmHg, respectivamente).

5.4 O tratamento com sildenafil por sete dias restaura desequilíbrio autonômico em ratos hipertensos

Para testar se o tratamento foi eficiente na correção do desequilíbrio autonômico em animais 2R1C, o tônus simpático e vagal para o coração foram medidos como o ΔFC após bloqueio farmacológico com propranolol e atropina respectivamente (Figuras 15 e 16). O tônus simpático cardíaco estava aumentado no grupo 2R1C + veículo quando comparados com ratos sham não-tratados ($-60,9 \pm 8$ bpm vs. -23 ± 4 bpm, $p < 0,01$). Além disso, tônus vagal cardíaco foi reduzido na hipertensão ($54,7 \pm 8$ vs. $115,8 \pm 10$ bpm, $p < 0,01$). O tratamento com sildenafil durante sete dias normalizou o tônus simpático ($-24,5 \pm 3$ bpm, $p < 0,01$) e vagal (110 ± 9 bpm, $p < 0,01$) em ratos com hipertensão renovascular. Não foram encontradas diferenças no grupo sham + sildenafil quando comparado com sham + veículo.

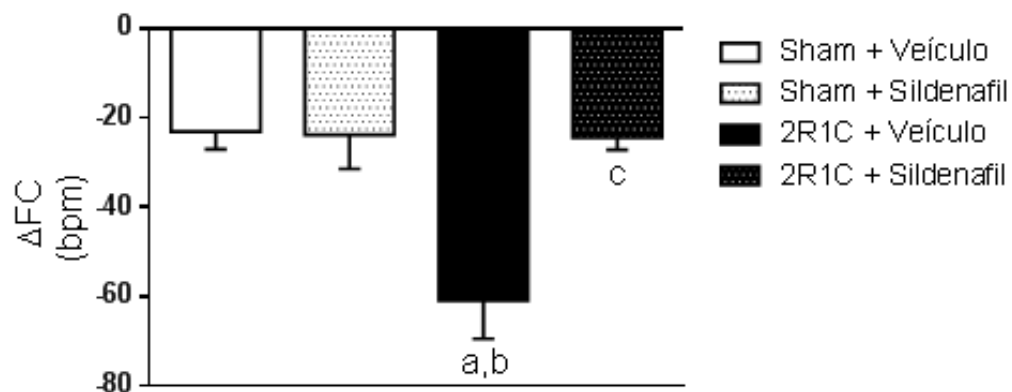


Figura 15: Efeitos do tratamento com sildenafil no tônus autonômico ao coração. Bloqueio com propranolol no ΔFC ($p < 0,01$ vs. sham + veículo; b $p < 0,01$ vs sham + sildenafil; c $p < 0,01$ versus 2R1C + veículo). ANOVA de uma via.

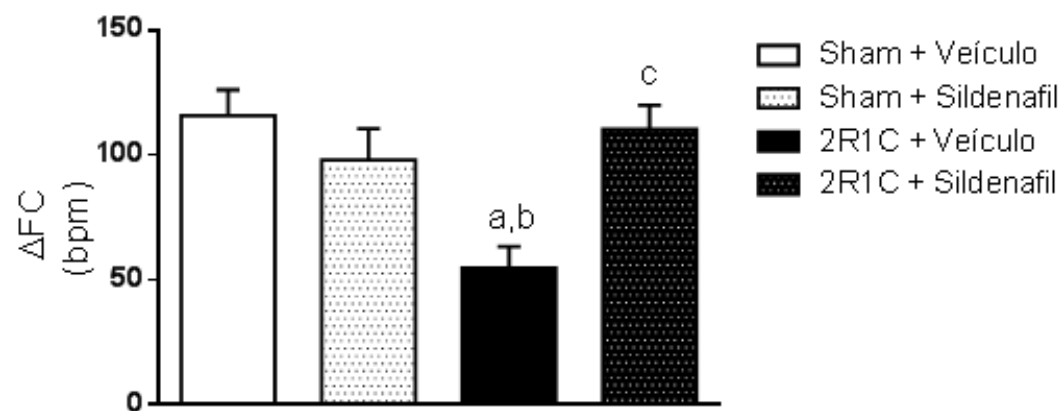


Figura 16: Efeitos do tratamento com sildenafil no tônus autonômico ao coração. Bloqueio com atropina no ΔFC ($p < 0,01$ vs. sham + veículo; b $p < 0,05$ vs. sham + sildenafil; c $p < 0,01$ versus 2R1C + veículo). ANOVA de uma via.

O barorreflexo espontâneo foi avaliado antes e após bloqueio autonômico (Tabela 2). Não foram encontradas diferenças no barorreflexo espontâneo após o bloqueio com atropina ou propranolol dentro dos grupos e entre grupos diferentes.

Tabela 2: Valores do ganho do barorreflexo espontâneo antes e depois do bloqueio autonômico

	Antes do bloqueio	Depois da atropina	Depois do propranolol
Sham + Veículo	-3,95 ± 0,46	-3,52 ± 0,77	-3,73 ± 0,80
Sham + Sildenafil	-3,65 ± 0,40	-3,67 ± 0,63	-4,64 ± 0,42
2R1C + Veículo	-1,90 ± 0,22 ^{a,b}	-2,41 ± 0,25	-2,73 ± 0,53
2R1C + Sildenafil	-3,51 ± 0,29 ^c	-3,62 ± 0,77	-3,23 ± 0,35

Os valores foram comparados por ANOVA de uma via para os diferentes grupos na mesma situação e pelo teste T para o mesmo grupo antes e após o bloqueio.

^a p < 0,01 vs sham + veículo

^b p < 0,05 vs sham + sildenafil

^c p < 0,05 versus veículo + 2R1C

Também foram comparados os valores de pressão arterial média e frequência cardíaca antes das diferentes drogas e não houve diferença entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Valores de PAM e FC antes das diferentes drogas

	Antes do Teste do barorreflexo		Depois do primeiro bloqueio autonômico		Depois do segundo bloqueio autonômico	
	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Sham + Veículo	116 ± 3	390 ± 12	124 ± 4	355 ± 10	126 ± 2	347 ± 10
Sham + Sildenafil	121 ± 7	370 ± 21	120 ± 6	369 ± 15	116 ± 6	383 ± 22
2R1C + Veículo	177 ± 6	381 ± 13	186 ± 10	390 ± 15	176 ± 14	402 ± 21
2R1C + Sildenafil	144 ± 3	367 ± 9	151 ± 8	329 ± 10	149 ± 6	328 ± 18

Os valores foram comparados por ANOVA de uma via para o mesmo grupo nas três situações diferentes. Não houve nenhuma diferença.

5.5 Tratamento com sildenafil reduziu o estresse oxidativo em ratos hipertensos

A quantificação de malondialdeído, um produto final da peroxidação lipídica, está resumida na Figura 17. Um aumento na concentração de MDA de cerca de 30% foi observado em animais 2R1C não tratados, que receberam apenas veículo, em comparação com os controles ($1,67 \pm 0,08$ vs. $1,29 \pm 0,06$ nmol/m, $p < 0,05$). O tratamento por sete dias com sildenafil dos ratos 2R1C foi capaz de reduzir os níveis de MDA, quando comparados aos animais hipertensos + salina ($1,04 \pm 0,07$ vs. $1,67 \pm 0,08$ nmol/mL, $p < 0,05$). Em relação ao tratamento dos animais sham com sildenafil não houve alteração da concentração de malondialdeído.

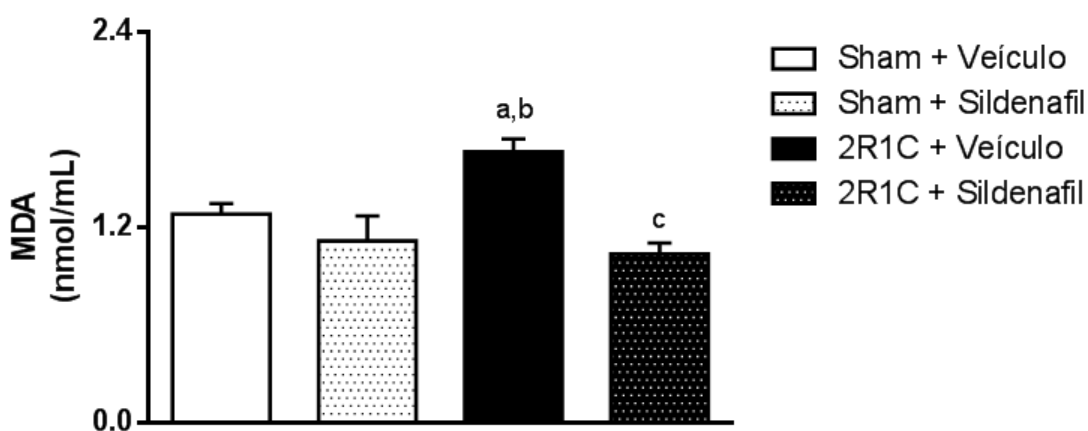


Figura 17: Efeitos do sildenafil sobre o estresse oxidativo em ratos hipertensos. Quantificação de malondialdeído no soro dos diferentes grupos (a $p < 0,05$ vs. sham + veículo; b $p < 0,01$ vs. sham + sildenafil, c $p < 0,01$ vs. 2R1C + veículo)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO discutir sildenafil gmpc e calcioe trabalho de Rubens fazan 2008 e taquicardia uso cronico

Este estudo teve como objetivo investigar se o tratamento oral por sete dias com sildenafil, um inibidor específico da PDE5, poderia melhorar o controle barorreflexo da pressão arterial e diminuir o estresse oxidativo em ratos com hipertensão renovascular. Este estudo é parte de uma série de trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa para avaliar os efeitos da administração de sildenafil em modelos animais de doenças cardiovasculares, numa perspectiva de medicina translacional.

A redução da massa do rim direito foi confirmada pela redução na relação de peso do rim/peso corporal em ambos os grupos 2R1C. O tratamento com sildenafil não modificou este parâmetro (Tabela 1). Embora os resultados anteriores de nosso grupo em ratos 2R1C tenham demonstrado que a inibição crônica da PDE5 foi capaz de reduzir a atrofia do rim clipado (DIAS et al., 2014a, b), esta diferença pode ser explicada pelo fato de que o tratamento começou 14 dias após a cirurgia de indução da hipertensão, quando a hipertensão renovascular ainda está em desenvolvimento e ainda não está totalmente estabelecida (NAVAR et al., 1998). Apesar do peso corporal final ter sido diferente no grupo sham + sildenafil, isto não parece ser um efeito do tratamento, uma vez que não foi observada redução de peso no grupo 2R1C + sildenafil e tampouco a redução de peso está descrita na literatura.

Os novos achados são que a administração oral por sete dias do sildenafil em ratos 2R1C reduziu a pressão arterial e melhorou o controle barorreflexo. Além disso, o tratamento resultou em uma diminuição dos níveis séricos de MDA, que é um indicativo de estresse oxidativo. Juntos, esses efeitos favoráveis do tratamento com sildenafil contribuíram para a redução da pressão arterial em ratos hipertensos tratados. O sildenafil pode ser considerado como uma alternativa para o tratamento de pacientes hipertensos resistentes. Ele está atualmente disponível para o tratamento de disfunção erétil devido ao seu efeito vasodilatador no corpo cavernoso (SHUKLA et al, 2005; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Tem sido também descrito que o sildenafil é eficaz na promoção da vasodilatação sistêmica, a qual pode contribuir para o seu efeito anti-hipertensivo (RAJA; NAYAK, 2004; OLIVER et al, 2006).

A eficácia do tratamento com sildenafil na redução da pressão arterial média em ratos 2R1C é notável (Figuras 9 e 10). Esta observação está de acordo com resultados anteriores realizados em camundongos 2R1C. A administração de sildenafil (40 mg/kg/dia, via oral) por duas semanas em camundongos C57BL com hipertensão renovascular resultou na redução da PA e melhora da função endotelial pelo equilíbrio NO/EROs (DIAS et al, 2014; FAHNING et al, 2015), como também normalização dos níveis de Ang I e II intra-renal e aumento de Ang 1-7 (DIAS et al, 2014). Outros trabalhos com ratos demonstram o efeito benéfico de inibidores da PDE5 sobre a PA (STEGBAUER et al, 2013). Tratamento com atorvastatina (45mg/kg) e sildenafil (50mg/kg) em ratos por 8 semanas resultou em um efeito antioxidante, diminuição da atividade vascular da NADPH, melhora da função vascular e redução da PA (GUIMARÃES et al, 2013).

Em ratos normotensos, o sildenafil não modificou a pressão sanguínea, o que está em conformidade com o descrito anteriormente (FERREIRA-MELO et al, 2006; ROSSONI et al, 2007). Em seres humanos, o tratamento de pacientes hipertensos com sildenafil durante 15 dias foi capaz de reduzir a pressão sanguínea num grau semelhante ao utilizado com drogas anti-hipertensivas, quando administrados como monoterapia (OLIVER et al, 2006). Em outros estudos, também com sildenafil, observou-se melhora nos níveis pressóricos de pacientes com hipertensão resistente (OLIVER et al, 2010; QUINAGLIA et al, 2013).

É importante realçar que a redução na pressão arterial induzida pelo tratamento com sildenafil não foi acompanhada por um aumento na frequência cardíaca (Figura 11). Isto também foi observado em pacientes hipertensos que receberam sildenafil cronicamente (OLIVER et al, 2006). Estudos anteriores em ratos hipertensos encontraram uma ligeira diminuição da resistência vascular periférica total após a inibição crônica da PDE5, sem alterações de FC. Isto sugeriu que o efeito de redução da pressão sanguínea da droga não desencadeia uma resposta taquicárdica reflexa (FERREIRA-MELO et al, 2006). Esta observação é crucial porque uma preocupação da administração crônica do sildenafil é o potencial de ativação simpática, o que poderia limitar ou neutralizar efeito redutor da pressão arterial (TADDEI; GHIADONI, 2006).

Apesar de ter sido descrito que a injeção intracerebroventricular e intratecal de sildenafil agudamente aumentam a pressão sanguínea e atividade simpática lombar em ratos (FAZAN et al, 2008; BOMBARDA et al, 2011) e que, em seres humanos, uma dose única de sildenafil aumentou atividade simpática vascular avaliada por noradrenalina plasmática (DOPP et al, 2013), estes resultados ainda são controversos. Diferentes estudos clínicos apoiam a ideia de que o sildenafil administrado por via oral não aumenta a atividade simpática em humanos (TADDEI; GHIADONI, 2006; STIRBAN et al, 2009). No presente trabalho observou-se que o tratamento não aumentou a atividade simpática para o coração (Figura 15). Pelo contrário, animais 2R1C + sildenafil mostraram redução da atividade simpática para o coração, quando comparados com os animais hipertensos não tratados.

Um achado importante do presente trabalho é que o sildenafil foi eficiente na restauração na sensibilidade do barorreflexo tanto induzido por drogas como espontâneo (Figura 13 e 14), que está prejudicado em ratos 2R1C, como descrito anteriormente (BOTELHO-ONO et al, 2011; QUEIROZ et al, 2012). Embora a adaptação do método de Oxford utilizando doses únicas de NPS e FEN para avaliar sensibilidade do barorreflexo induzido por drogas pode não ser a abordagem mais adequada para demonstrar a função do barorreflexo, este método é bem aceito na literatura (BRAGA et al, 2008; BOTELHO-ONO et al, 2011; MONTEIRO et al, 2012; ALVES et al, 2015). A principal limitação do uso de doses individuais *in bolus* de drogas vasoativas para avaliar a função do barorreflexo é que não é possível construir uma curva sigmóide completa, que seria mais informativa. Isto pode afetar a interpretação dos dados uma vez que cada grupo pode estar em diferentes partes da curva barorreflexo. Por isso, o barorreflexo espontâneo foi avaliado para cada grupo. Independentemente do ponto na curva do barorreflexo, os nossos dados sobre a sensibilidade do barorreflexo induzido por drogas são suportados pelos dados barorreflexo espontâneo, ambos mostrando que o sildenafil melhora a função barorreflexa em ratos 2R1C. É importante destacar que as diferenças na SBRE não foram evidentes entre os grupos após o bloqueio autonômico. Isto pode ser explicado pelo fato de que, sob efeito de bloqueio autonômico, a técnica da sequência torna-se menos precisa na estimativa ganho barorreflexo (STAUSS et al, 2006).

Hoje em dia, é bem aceito que os prejuízos de mecanismos subjacentes ao controle barorreflexo da pressão sanguínea na hipertensão envolvem, pelo menos em parte, aumento do estresse oxidativo mediado por Ang II ao longo do eixo formado pelo órgão subfornical, núcleo paraventricular do hipotálamo e bulbo ventrolateral rostral (SFO-PVN-RVLM) (BRAGA et al, 2011; DE QUEIROZ et al, 2013). Foi mostrado que o sildenafil pode interferir no SRAA durante a hipertensão. Catorze dias de tratamento de animais 2R1C com sildenafil resultou na redução da Ang II no rim clipado, e aumento na Ang 1-7 em rim e no plasma (DIAS et al, 2014a, b). A Ang 1-7 é um produto da clivagem da Ang II pela enzima ECA2. Ele atua em um receptor acoplado a proteína G (receptor Mas) e tem efeitos opostos aos da Ang II (SANTOS et al, 2013). Embora não tenha sido medido diretamente no presente trabalho, não podemos descartar a possibilidade de que o tratamento com sildenafil diminui a cascata de sinalização do SRAA em regiões do cérebro envolvidas no controle cardiovascular, como eixo SFO-PVN-RVLM.

Curiosamente, Aboutabl e colegas mostraram que a inibição crônica da PDE5 reduziu a pressão sanguínea em ratos deficientes em NO e aumentou a concentração de nitrito/nitrato plasmática, assim como os níveis de GMPc, o que sugere que o tratamento com sildenafil pode restaurar, pelo menos em parte, a via do NO/GMPc neste modelo (ABOUTABL et al, 2008). É importante ressaltar que o estresse oxidativo e produção excessiva de EROs estão envolvidos na diminuição da biodisponibilidade do NO devido à reação com superóxido para formar peroxinitrito (TOUYZ, 2004). É bem conhecido que EROs e NO desempenham um papel regulador fundamental na neurotransmissão em importantes áreas do cérebro de controle cardiovascular (KISHI et al, 2001; KISHI; HIROOKA, 2012; NISHIHARA et al, 2012a, b). Foi anteriormente mostrado pelo nosso grupo que, em adição ao seu mecanismo de ação clássico, o sildenafil também é capaz de aumentar a biodisponibilidade de NO em aorta e mesentério (DIAS et al, 2014a; LEAL et al, 2015). Se o mesmo mecanismo ocorre em cérebro, isto poderia explicar a melhora no desequilíbrio autonômico promovida pelo tratamento com sildenafil em ratos hipertensos (Figura 15 e 16). Animais 2R1C tratados apresentaram diminuição no tônus simpático e aumento do tônus parassimpático para o coração. A falta de medida direta da atividade do nervo simpático é uma limitação do

estudo. Ainda, não está claro se a melhoria de barorreflexo é uma causa ou uma consequência da redução da pressão arterial em animais tratados. No entanto, numa perspectiva translacional, o objetivo principal de qualquer terapia anti-hipertensiva é reduzir a pressão arterial, e isto foi alcançado pelo tratamento no presente trabalho.

Os inibidores da fosfodilestarase apresentaram atividade antioxidante e reduzem os níveis de MDA no plasma em ratos diabéticos tratados (MILANI et al, 2005). Isto está de acordo com nossos achados visto que no presente estudo verificou-se que a inibição da PDE5 diminuiu a peroxidação lipídica do soro, um marcador de estresse oxidativo sistêmico. Foi demonstrado que o aumento de MDA no soro está associado ao aumento do estresse oxidativo em RVLM e PVN em ratos 2R1C (CAMPOS et al., 2011). O efeito antioxidante observado do sildenafil está de acordo com investigações anteriores de nosso grupo de pesquisa (BALARINI et al, 2013; RODRIGUES et al, 2013; DIAS et al, 2014b; FAHNING et al, 2015) e de outros grupos (KOUPPARIS et al, 2005; SHUKLA et al, 2005; SCHÄFER et al, 2008; BIVALACQUA et al, 2009; GUIMARÃES et al, 2013) em diferentes tecidos. Ainda, há estudos que demonstram que o tratamento com sildenafil provocou uma redução dos níveis citoplasmáticos de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio somados a efeitos protetores no DNA de células de medula óssea de camundongos nocautes para apolipoproteína E (BERNADES et al, 2016). Acreditamos que a melhoria da sensibilidade do barorreflexo está diretamente envolvida com a redução das EROs, uma vez que diferentes trabalhos do nosso grupo (NUNES et al, 2010; GUIMARÃES et al, 2012; MONTEIRO et al, 2012; QUEIROZ et al, 2012; ALVES et al., 2015) e outros (NISHI et al., 2010b, 2013) apoiam a ideia de que o tratamento antioxidante com moléculas naturais ou sintéticas pode aumentar o ganho do barorreflexo na hipertensão experimental. O estresse oxidativo ao longo do eixo SFO-PVN-RVLM está envolvido no controle barorreflexo diminuído da pressão sanguínea durante a hipertensão (BRAGA et al., 2011). Considerando que o sildenafil pode atravessar a barreira hemato-encefálica e agir centralmente (RAJA; NAYAK, 2004), nosso próximo passo é investigar se a inibição crônica da PDE5 com sildenafil diminui centralmente estresse oxidativo nas principais áreas do cérebro envolvidas no controle cardiovascular e do tônus simpático. Embora tenha sido demonstrado que a inibição de PDE5 pode diminuir o

estresse oxidativo devido a redução na expressão de proteínas importantes, como NAD(P)H oxidase subunidade gp91^{phox} e Rac nas cascatas de produção de EROs (SCHÄFER et al., 2008), a informação sobre os resultados semelhantes no sistema nervoso central não se encontra ainda disponível.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este é o primeiro estudo a mostrar que a inibição da PDE5, por meio do citrato de sildenafil, é capaz de melhorar a sensibilidade do barorreflexo em ratos com hipertensão renovascular. Essa melhora está associada à correção do desequilíbrio autonômico em ratos 2R1C. Também foi documentado que o tratamento com sildenafil foi eficiente na redução do estresse oxidativo sistêmico e redução da pressão sanguínea em animais hipertensos tratados com sildenafil. Este estudo reforça o conceito de que a administração crônica de inibidores de PDE5 pode ser útil na normalização da pressão sanguínea em pacientes resistentes.

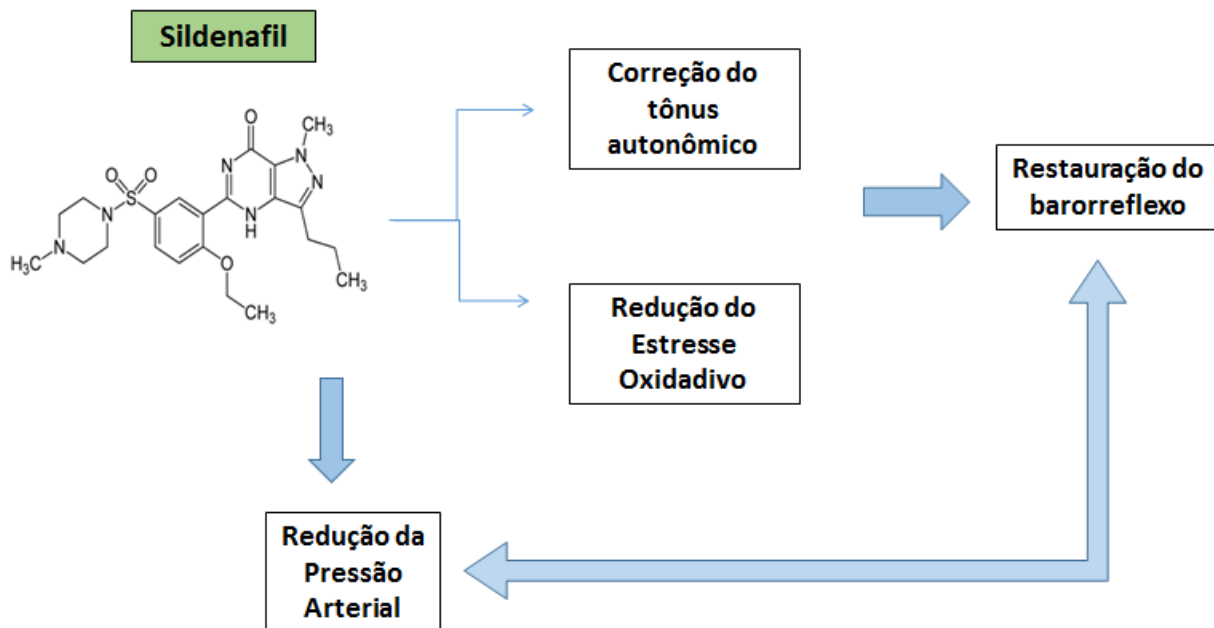


Figura 18: Esquema representativo das principais observações deste estudo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AL GHOULEH I et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. **Free Radic Biol Med.**, v.51, n. 7, p.1271-88, oct, 2011.

ABOUTABL, M. E. et al. Sildenafil augments the beneficial hemodynamic and histopathological effects of amlodipine in nitric oxide-deficient hypertensive rats: role of nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Pharmacol. Res.**, v.57, p.456–463, 2008.

ALVES, N. F. B. et al. Coco nut oil supplementation and physical exercise improves Baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab**, v. 400, p.393–400, 2015.

BADER, M. Tissue renin–angiotensin–aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.50, p. 439–465, 2010.

BALARINI, C. M, et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. **Journal of Translational Medicine**, v.11, n.3, 2013.

BENDER, A. T; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. **Pharmacol Rev.**, v. 58, p. 488–520, 2006.

BIANCARDI, V. C et al. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. **Hypertension**, v.63, n.3, p.:572-579, 2014.

BIVALACQUA, T. J. et al. Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of second hand smoke induced erectile dysfunction. **J.Urol.**, v.181, p. 899–906, 2009.

BOMBARDA, G. et al. Role of cGMP and cAMP in the hemodynamic response to intrathecal sildenafil administration. **Clinics**, v.66, p.1407–1412, 2011.

BOTELHO-ONO, M. S. et al. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Auton.Neurosci.**, v.159, p. 38–44, 2011.

BRAGA, V. A. et al. Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v. 295, p. R1168–R1174, 2008b.

BRAGA, V. A. et al. Selective ablation of AT1a receptors in rostral ventrolateral medulla (RVLM) prevents chronic angiotensin-II-dependent hypertension in part by reducing oxidant stress in this region. **Hypertension** , v.52, 2008a.

BRAGA, V. A; COLOMBARI, E; JOVITA, M. G. Angiotensin II-derived reactive oxygen species underpinning the processing of the cardiovascular reflexes in the medulla oblongata. **Neurosci**, v. 27, n.4, p.:269–274, 2011.

BRAGA, V. A. et al. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.44, p.871–876, 2011.

BRAGA, V. A. Depressed Baroreflex Sensitivity in Hypertensive Rats: A Role for Reactive Oxygen Species. **J. Hypertens**, v.1, e103, 2012.

BERNARDES, F. P. et al. Protective effect of sildenafil on the genotoxicity and cytotoxicity in apolipoprotein E-deficient mice bone marrow cells. **Lipids Health Dis.**, v. 15, n.1, p.100, 2016.

BERRY, C. et al. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: Angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. **Circulation** , v.101, p.2206–2212, 2000.

CAMPAGNARO, B. P. et al. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. **Int.J.Hypertens**. 2012.

CAMPOS, R. R. et al The role of oxidative stress in renovascular hypertension. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.**, v.38, p. 144–152, 2011.

CARVALHO, A. S. et al. Brain Angiotensin-II-derived Reactive Oxygen Species: Implications for High Blood Pressure . **J Hypertens** , v. 1:3, 2012.

CHAMPLAIN, J. et al. Oxidative stress in hypertension. **Clin Exp Hypertens.**, v.26, n.7-8, p. 593-601, 2004.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, p. 1206–1252, 2003.

CHOPRA, S; BABY, C; JACOB, J. J. Neuro-endocrine regulation of blod pressure. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.15, n. Suppl4, p.S281-S288, out. 2011.

CUSHMAN, D. W; ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nat Med.**, v. 5, p.1110–1113, 1999.

DAS, A; XI, L; KUKREJA, R. C. Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling. **J Biol Chem.**, v. 280, p. 12944–12955, 2005.

DIAS, A. T. et al. Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. **J.Transl.Med.**, v.12, n. 250, 2014a.

DIAS, A. T. et al. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidney sin mice with renovascular hypertension. **J.Transl.Med.**, v. 12, n. 35, 2014b.

DOPP, J. M. et al. Sildenafil in creases sympathetically mediated vascular tone in humans. **Am. J. Hypertens.**, v.26, p.762–769, 2013.

DONAUGHY, T. L.O; RESTA, T.C; WAKER, B.R. Laboratory demonstration of baroreflex control of heart rate in conscious rats. *Advances in Physiology Education Published*,v. 26, n. 4, p. 309-316, 2002.

ERIN, A; TEXTOR, S. C; LERMAN, L. O. Emerging concepts for patients with treatment-resistant hypertension.**Trends Cardiovasc Med.**, S1050-1738, n.16, p. 30048-30052, maio 2016.

FAHNING, B. et al. Sildenafil Improves Vascular Endothelial Structure and Function in Renovascular Hypertension. **Curr. Pharm. Biotechnol**, v.16, p. 823–831, 2015.

FAZAN, R. et al. Sildenafil acts on the central nervous system increasing sympathetic activity. **J. Appl. Physiol.**, v.104, p.1683–1689, 2008.

FERREIRA-MELO, S. E. et al. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardio myopathy in NOS inhibitor-treated rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 542, p.141–147, 2006.

FORSTERMANN, U; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J.**, v. 33, n.7, p. 829- 837, abr 2012.

KISHI, T. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension. **Hypertension Research.**, v.36, n.10, p.845-851, 2013.

KISHI, T. et al. Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. **Hypertension**, v. 38, p. 896–901, 2001.

KISHI, T; HIROOKA, Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation.**Frontiers in Physiology**, v.3, 2012.

KOUPPARIS, A. J. et al. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47 NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. **BJU International**, v.96, n.3, p.423–427, 2005.

KUKREJA, R. C. et al. Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. **Exp Clin Cardiol**, v. 16, n.4, p.30–35, 2011.

GEISZT, M. NADPH oxidases: new kids on the block. **Cardiovasc Res**, v. 71, n. 2, p.289–99, 2006.

GOLDBLATT, H. et al. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med**, v.59, p.347–378, 1934.

GHOFRANI, H. A; OSTERLOH, I. H; GRIMMINGER, F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, p.689–702, 2006.

GRIENDLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ. Res**, v.74, p. 1141–1148, 1994.

GRASSI, G. et al. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. **Hypertension**, v. 31, p. 68–72, 1998.

GRASSI, G; MARK, A; ESLER, M. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. **Circ.Res**, v.116, p.976–99, 2015.

GUIMARÃES, D. D; CARVALHO, C. C; BRAGA, V. A. Scavenging of NADPH oxidase-derived superoxide anions improves depressed baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, v.39, p. 373–378, 2012.

GUIMARÃES, D. D. et al. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. **Redox Biol**, v.1, p. 578–585, 2013.

GUYTON, A. C et al. Arterial pressure regulation. Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. **Am J Med**. v. 52, 584–594, 1972.

HACKENTHAL, E. et al. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiol Rev**, v. 70, p.1067–1116, 1990.

HARRISON, D. G. et al. Role of the adaptive immune system in hypertension. **Curr Opin Pharmacol**, v.10, p. 203–207, 2010.

HILL, R. W; WYSE, G. A; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. 2ª ed, Artmed, 2012.

JOHNSTON, C. L; FRANZ, V. Renin Angiotensin system: A dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. **J Hypertens Suppl.** v. 10, p.13–26, 1992.

LEAL, M. A. et al. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of athero-sclerosis: the beneficial effects of sildenafil. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v.16, p.517–530, 2015.

LERMAN, L. O. et al. Animals models of hypertension: an overview. **J Lab Clin Med**, v. 146, p.160-173, 2005.

MARC, Y; LLORENS-CORTES, C. The role of the brain renin-angiotensin system in hypertension: implications for new treatment. **Prog Neurobiol.**, v.95,n.2, p.89-103, 2011.

MENDES-JUNIOR, L. G. et al. Oral supplementation with the rutin improves cardiovagal baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism.**, v.38, n.11,p.1099-106, 2013.

MENDOZA, A; LAZARTIGUES, E. The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges. **Ther Adv Cardiovasc Dis.**, v.9, n.4, p.201-208, 2015.

MILANI, E. et al. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 140, n. 2, p. 251–255, 2005.

MONCADA, S; HIGGS, A. Mechanisms of Disease: The L-arginine-nitric-oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONTEIRO, M. M. et al. Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Molecules.**, v.17, n.11, p.12997-3008, 2012.

MONTEZANO, A. C; TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. **Antioxid Redox Signal.**, v. 20, n. 1, p.164–182, 2014.

NAVAR, L. G; IMIG, J. D; ZOU, L; WANG, C. T. Intrarenal production of angiotensin II. **Semin Nephrol**, v.17, p.412–422, 1997.

NAVAR, L. G. et al. Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. **News Physiol. Sci.**, v.13, p. 170–176, 1998.

NISHI, E. E et al. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. **American Journal of Hypertension**, v.23, n.5, p.473-480, 2010b.

NISHI, E. E. et al. Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v.26, p. 858–865, 2013.

NISHIHARA, M. et al. Different role of oxidative stress in paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla in cardiovascular regulation in awake spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v.30, p.1758–1765, 2012a.

NISHIHARA, M. et al. Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v.30, p. 97–106, 2012b.

OCKAILI, R. et al. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 283, n.3, p.H1263-269, set 2002.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Kidney-induced hypertension depends on superoxide signaling in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension**, v.56, p.290-296, 2010.

OLIVEIRA-SALES, E. B et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, v.21, p.98-104, 2008.

OLIVEIRA-SALES, E. B et al. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, v.22, p.484–492, 2009.

OLIVER, J. J. et al. Clinical potential of combined organic nitrate and phosphodiesterase type 5 inhibitor in treatment-resistant hypertension. **Hypertension**, v.56, p. 62–67, 2010.

OLIVER, J. J; MELVILLE, V. P; WEBB, D. J. Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. **Hypertension**, v. 48, p.622–627, 2006.

PACHER, P; BECKMAN, J. S; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiology Reviews**, v.87, n.1, p.315–424, 2007.

PIMENTA, E; CALHOUN, D. A. Resistant hypertension: incidence, prevalence and prognosis. **Circulation**, v.125, n.13, p.1594-1596, 2012.

PHILLIPS, M. I; SUMNERS, C. A angiotensina II na fisiologia do sistema nervoso central. **Regul Pept** , v.78, p.1-11, 1998.

PRAXEDES, J. N. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. **Rev Bras Hipertens**, v. 9, n.2, abril/junho, 2002.

QUEIROZ, T. M; MONTEIRO, M. M. O; BRAGA, V. A. Angiotensin-II- derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. **Front.Physiol.**, v.4, n.105, may 2013.

QUEIROZ, T. M. et al. A-lipoic acid reduces hypertension and increases baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Molecules**, v. 17, p. 13357–13367, 2012.

QUINAGLIA, T. et al. Acute cardiac and hemodynamic effects of sildenafil on resistant hypertension. **Eur J Clin Pharmacol.**, v. 69, p.2027–2036, 2013.

RAJA, S. G; NAYAK, S. H. Sildenafil: emerging cardiovascular indications. **Ann. Thorac. Surg.**, v.78, p. 1496–1506, 2004.

RODRIGUES, B. P. et al. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. **Lipids Health Dis.**, v.12, n.128, 2013.

ROSANIO, S. et al. Enhanced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury with combining sildenafil with low-dose atorvastatin. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v. 20, p. 27–36, 2006.

ROSSONI, G. et al. Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia-reperfusion damage in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v.150, p.567–576, 2007.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **J.Endocrinol.**, v.216,R1–R17, 2013.

SALGADO, M. C. et al. Role of nitric oxide and prostanoids in attenuation of rapid baroreceptor resetting. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.290, p.1059–1063, 2009.

SCALA, L. C. N; MAGALHÃES, L. B. N. C; MACHADO, C. A. Epidemiologia e prevenção primária da hipertensão arterial. In: Paola AAV, Barbosa MB, Guimarães JI. Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Barueri: Manole. p. 235-238, 2012.

SCHÄFER, A. et al. Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. **Br.J.Pharmacol.**,v.153, p.886–893, 2008.

SCHWARTZ, B. G. et al. Cardiac uses of phosphodiesterase-5 inhibitors. **J Am Coll Cardiol.**, v. 59, n.1, p. 9-15, jan 2012.

SCHNERMANN, J. B. et al. Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptordeficient mice. **Am J Physiol**, v. 273, p. 315–320, 1997.

SESHIAH, P. N. et al. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. **Circ Res.**, v. 91, n. 5, p.406-13, 2002.

SHUKLA, N.. et al. Effect of sildenafil citrate and anitricoxidedonating sildenafil derivative, NCX911, on caverno sal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. **Eur.J.Pharmacol.**, v.517, p.224–231, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arq Bras. Cardiol.**, v.95, 1supl.1, p.1-51, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Posicionamento Brasileiro Sobre Hipertensão Arterial Resistente First Brazilian Position on Resistant Hypertension. **Arq Bras Cardiol**, v.99, n.1, p. 576-585, 2012.

SOUBRIER,F. et al. Molecular biology of the angiotensin I-converting enzyme: II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. **J Hypertens**, v.11, p. 599-604, 1993.

SOUZA H. C. et al. Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. **Auton.Neurosci.**, v.139, p.38–45, 2008.

STAUSS, H. M. et al. Baroreceptor reflex sensitivity estimated by the sequence techniques reliable in rats. **Am.J.Physiol.HeartCirc.Physiol.**, v. 291, p. H482–H483, 2006.

STEGBAUER, J. et al. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. **PLoS ONE**, v.8, e80674, 2013.

STEGBAUER, J; COFFMAN, T. M. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.20, p. 84-88, 2011.

STIRBAN, A. et al. Acute effects of sildenafil onflow mediated dilatation and cardiovascular autonomic nerve function in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab.Res.Rev.**, v. 25,p. 136–143, 2009.

SHUKLA, N. et al. 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.**, v.517, p.224–231, 2005.

TADDEI, S; GHIADONI, L. Phosphodiesterase 5 inhibition to treat essential hypertension:isthisthebeginningofthestory? **Hypertension**, v. 48, p. 546–548, 2006.

TAKIMOTO, E. et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. **Nat Med.**, v.11, n.2, p. 214-222, fev 2005.

TOUYZ, R. M. Reactive oxygen species,vascular oxidative stress,and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v. 44, p.248–252, 2004.

TOUYZ, R. M. et al. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. **Mol Interv.**, v.11, n. 1,p.27-35, 2011.

VASQUEZ, E. C. et al. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.30, n.4, p.521-532, 1997.

VERTUANI, S; ANGUSTI, A; MANFREDINI, S.The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. **Curr Pharm Des.**, v. 10, n.14, p.1677-94, 2004.

WALKER, D. K. et al. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat,rabbit,dog and man. **Xenobiotica**, v. 29, p. 297–310, 1999.

WESTERMANN, D. et al. 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.**, v. 107, n.6, p.308, nov, 2012.

XIA, H. et al. Brain angiotensin-converting enzyme type 2 shedding contribute to the development of neurogenic hypertension. **Circ.Res.**, v.113, p. 1087–1096, 2013.

YANAGISAWA, M. et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**.v.332, p.411–415, 1988.

YE, S. et al. Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypertension. **Hypertension**, v. 48, n.2, p. 309-15, 2006.

ZIMMERMAN, M. C. et al. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. **Circ. Res.**, v. 95, p. 210–216, 2004.

ANEXO

ANEXO - CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIDÃO

João Pessoa, 31 de julho de 2015.
CEUA nº 042/2015.

Ilmo(a): **Profa. Dra. Camille de Moura Balarini**
Departamento de Fisiologia e Patologia – CCS – UFPB

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **17/05/2015** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EFEITO DO CITRATO DE SILDENAFIL SOBRE O CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL: FOCO NO BALANÇO AUTONÔMICO.**

Com previsão de empregar **64 ratos Wistar**;
Animais do **Biotério Prof. Thomas George**;
Para serem utilizados no período de **julho/2015 a julho/2016**.

Atenciosamente,

Islandia Giselia Albuquerque Gonçalves

Profa. Dra. Islandia Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB

Profª. Drª. Islandia G. A. Gonçalves
Coordenadora CEUA/UFPB
SIAPE 3366301

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Federal da Paraíba
www.ufpb.br/ceua/ - ceua@ufpb.br

APÊNDICE



Inhibition of PDE5 Restores Depressed Baroreflex Sensitivity in Renovascular Hypertensive Rats

Clênia de Oliveira Cavalcanti¹, Rafael R. Alves^{2,3}, Alessandro L. de Oliveira^{2,3}, Josiane de Campos Cruz¹, Maria do Socorro de França-Silva¹, Valdir de Andrade Braga¹ and Camille de Moura Balarini^{1,3*}

¹ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ² Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil, ³ Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Debra I. Diz,
Wake Forest University School of
Medicine, USA

Reviewed by:

Patrick J. Mueller,
Wayne State University, USA
Abdel Abdel-Rahman,
East Carolina University Brody School
of Medicine, USA

*Correspondence:

Camille de Moura Balarini
camille.balarini@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Integrative Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 02 August 2015

Accepted: 11 January 2016

Published: 28 January 2016

Citation:

Cavalcanti CO, Alves RR, Oliveira AL,
Cruz JC, França-Silva MS, Braga VA
and Balarini CM (2016) Inhibition of
PDE5 Restores Depressed Baroreflex
Sensitivity in Renovascular
Hypertensive Rats.
Front. Physiol. 7:15.
doi: 10.3389/fphys.2016.00015

Renal artery stenosis is frequently associated with resistant hypertension, which is defined as failure to normalize blood pressure (BP) even when combined drugs are used. Inhibition of PDE5 by sildenafil has been shown to increase endothelial function and decrease blood pressure in experimental models. However, no available study evaluated the baroreflex sensitivity nor autonomic balance in renovascular hypertensive rats treated with sildenafil. In a translational medicine perspective, our hypothesis is that sildenafil could improve autonomic imbalance and baroreflex sensitivity, contributing to lower blood pressure. Renovascular hypertensive 2-kidney-1-clip (2K1C) and sham rats were treated with sildenafil (45 mg/Kg/day) during 7 days. At the end of treatment, BP and heart rate (HR) were recorded in conscious rats after a 24-h-recovery period. Spontaneous and drug-induced baroreflex sensitivity and autonomic tone were evaluated; in addition, lipid peroxidation was measured in plasma samples. Treatment was efficient in increasing both spontaneous and induced baroreflex sensitivity in treated hypertensive animals. Inhibition of PDE5 was also capable of ameliorating autonomic imbalance in 2K1C rats and decreasing systemic oxidative stress. Taken together, these beneficial effects resulted in significant reductions in BP without affecting HR. We suggest that sildenafil could be considered as a promising alternative to treat resistant hypertension.

Keywords: resistant hypertension, sildenafil, baroreflex, nitric oxide, angiotensin-II

INTRODUCTION

Even though arterial hypertension is the most common modifiable risk factor for cardiovascular diseases, it is still an important health problem worldwide. It is predicted that its prevalence will reach 1/3 of global population by 2025 (Chokshi et al., 2013; Oparil and Schmieder, 2015). Stenosis of renal artery is frequently associated with resistant hypertension. In those patients, the usually available antihypertensive drugs protocol fail to normalize blood pressure (BP), even when in association (Faselis et al., 2011; Carey, 2013; Vongpatanasin, 2014). Therefore, the urgency in developing new approaches to treat arterial hypertension is clear. The experimental model of renovascular hypertension proposed by Goldblatt mimics human renovascular hypertension (Goldblatt et al., 1934; Navar et al., 1998). In that model, known as 2-kidney-1-clip (2K1C) model, the unilateral renal artery stenosis reduces renal perfusion and chronically stimulates the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS; Navar et al., 1998).

Several studies describe that the central control of BP is impaired during hypertension in humans and animal models, possibly due to autonomic dysfunction (Irigoyen and Krieger, 1998; Campagnaro et al., 2012; Grassi et al., 2015). Angiotensin II (Ang II) can directly affect central areas involved in autonomic control. The activation of type 1 Ang II receptor (AT1R) and the consequent production of reactive oxygen species (ROS) on different brain nuclei involved in autonomic control are currently well-accepted mechanisms for explaining autonomic dysfunction observed in arterial hypertension (Braga et al., 2011; de Queiroz et al., 2013). In recent studies, our group and others have shown that antioxidant therapy can reverse the reduced baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats (SHR) and in renovascular hypertensive rats (Nishi et al., 2010a; Botelho-Ono et al., 2011; Guimarães et al., 2012; Monteiro et al., 2012).

Sildenafil is a specific inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5), the enzyme responsible for degrading cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Thus, the main mechanism of action for this drug is the increase in nitric oxide (NO)/cGMP signaling pathway (Terrett et al., 1996; Palit and Eardley, 2010). In addition, our group has recently shown that sildenafil exhibits antioxidant properties (Balarini et al., 2013; Rodrigues et al., 2013; Dias et al., 2014b; Fahning et al., 2015; Leal et al., 2015). However, the efficacy of sildenafil in ameliorating central control of BP during arterial hypertension has not been investigated. In the present study, we aimed to evaluate the possible effects of sildenafil treatment on the central control of blood pressure through baroreflex sensitivity in 2K1C hypertensive rats. Furthermore, we evaluated whether the treatment was able to improve autonomic imbalance by reducing oxidative stress in those animals.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Thirty eight Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 150–200 g were used. Animals were bred and housed in a temperature and humidity-controlled room set to a 12/12 h dark/light cycle with access to water and regular chow (Labina®, Purina, SP, Brazil) *ad libitum*. Experimental procedures were performed in accordance with National Institutes of Health (NIH) guidelines and protocols were approved by Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA-UFPB protocol #042/2015).

Study Design

Animals were divided in four different groups: (1) Sham + vehicle ($n = 9$): animals were submitted to sham surgery and received vehicle during 7 days; (2) Sham + sildenafil ($n = 7$): animals were submitted to sham surgery and received sildenafil citrate during 7 days (45 mg/Kg/day) by gavage; (3) 2K1C + vehicle ($n = 11$): animals were submitted to renal artery clipping to induce renovascular hypertension and received vehicle during 7 days; and (4) 2K1C + sildenafil ($n = 11$): animals were submitted to renal artery clipping to induce renovascular hypertension and received sildenafil citrate during 7 days (45 mg/Kg/day by gavage). Sildenafil dose was chosen based on previous studies and on the difference on pharmacokinetics for sildenafil in different species (Walker

et al., 1999; Ferreira-Melo et al., 2006; Guimarães et al., 2013). Baseline blood pressure (BP) and heart rate (HR), baroreflex function and autonomic tone evaluation test were performed in most of the animals for each group, including the ones used for typical raw tracings representation. Firstly, baseline BP and HR were recorded for 40 min. For drug-induced baroreflex function studies, phenylephrine and sodium nitroprusside were randomly administered with 15 min interval between doses in order to guarantee that cardiovascular parameters were back to baseline values. Lastly, propranolol and atropine were randomly administered with 3 h interval between doses. Details are given in specific protocols ahead. Body weight and cardiovascular baseline values for each experimental protocol is shown in **Table 1** and **Table 2**, respectively.

Renal Artery Clipping

The induction of renovascular hypertension was performed as previously standardized in our laboratory (Botelho-Ono et al., 2011; Queiroz et al., 2012). Briefly, animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.). The surgical procedures were executed only after the absence of withdraw and corneal reflexes. Right renal artery was carefully exposed through a retroperitoneal incision. A U-shaped silver clip (0.2 mm wide opening) was positioned around renal artery to decrease renal blood flow. Sham animals underwent the same surgical process, except for the implantation of the silver clip. After 5 weeks of surgery, the treatment protocol with sildenafil or vehicle was started and continued for 7 days.

Hemodynamic Measures

Six weeks after the induction of hypertension (or sham surgery), rats were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively, i.p.) for catheters implantation and direct hemodynamic measurements. The surgical procedures were executed only after the absence of withdraw and corneal reflexes. Polyethylene catheters were inserted into the femoral artery and vein through a small inguinal incision in order to allowing blood pressure (BP) recordings and drug administration, respectively. Pulsatile arterial pressure was recorded using a pressure transducer (BRPL2, WPI, Sarasota, FL, USA) coupled to an amplifier and to an acquisition system (PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) using a specific software (LabChart 5.0, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia). Systolic arterial pressure (SAP), mean arterial pressure (MAP), diastolic arterial pressure (DAP), and heart rate (HR) were derived from the pulsatile arterial pressure online.

Baroreflex Sensitivity Test

Baroreflex sensitivity was evaluated after a 24-h-recovery from the catheter implantation surgery. After 40 min of blood pressure and heart rate baseline recordings, reflex responses were obtained using vasoactive drugs as previously described using the modified Oxford method (Botelho-Ono et al., 2011; Guimarães et al., 2012; Alves et al., 2015). Briefly, a single bolus injection of phenylephrine (PHE, 8 µg/Kg) or sodium nitroprusside (SNP, 25 µg/Kg) was randomly given in order to elicit changes in blood pressure, which were similar in all groups. The second

TABLE 1 | Weight values from the different groups.

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Right kidney/Body weight (mg/g)	Left kidney/Body weight (mg/g)	Heart weight/Body weight (mg/g)	Right kidney weight (g)	Left kidney weight (g)	Heart weight (g)
Sham + Vehicle	173.8 ± 3.7	289.7 ± 13.8	4.4 ± 0.14	4.2 ± 0.17	3.7 ± 0.16	1.3 ± 0.04	1.2 ± 0.05	1.1 ± 0.07
Sham + Sildenafil	157.1 ± 1.2 ^a	201.7 ± 12.6 ^a	4.3 ± 0.20	4.3 ± 0.23	4.2 ± 0.28	0.85 ± 0.04 ^d	0.9 ± 0.05 ^a	0.83 ± 0.05 ^d
2K1C + Vehicle	174.0 ± 2.8	272.8 ± 13.4	2.6 ± 0.37 ^{b,c}	4.3 ± 0.31	4.1 ± 0.22	0.74 ± 0.12 ^c	1.1 ± 0.05	1.1 ± 0.05
2K1C + Sildenafil	175.8 ± 4.2	283.3 ± 7.6	2.5 ± 0.4 ^{b,c}	4.4 ± 0.31	3.6 ± 0.21	0.70 ± 0.13 ^c	1.2 ± 0.08	1.0 ± 0.05

^a*p* < 0.01 vs. all other groups.^b*p* < 0.01 vs. both sham groups.^c*p* < 0.05 vs. left side from the same group.^d*p* < 0.05 vs. sham + vehicle.

TABLE 2 | Values of MAP and HR before different drugs.

	Before baroreflex test		Before first autonomic blockade		Before second autonomic blockade	
	MAP (mmHg)	HR (bpm)	MAP (mmHg)	HR (bpm)	MAP (mmHg)	HR (bpm)
Sham + Vehicle	116 ± 3	390 ± 12	124 ± 4	355 ± 10	126 ± 2	347 ± 10
Sham + Sildenafil	121 ± 7	370 ± 21	120 ± 6	369 ± 15	116 ± 6	383 ± 22
2K1C + Vehicle	177 ± 6	381 ± 13	186 ± 10	390 ± 15	176 ± 14	402 ± 21
2K1C + Sildenafil	144 ± 3	367 ± 9	151 ± 8	329 ± 10	149 ± 6	328 ± 18

Values were compared by one-way ANOVA for the same group in the three different situations. No differences were found.

drug was administrated only after MAP and HR had returned to baseline values (15 min interval between drugs). Cardiac baroreceptor reflex responses were evaluated at the maximum (peak changes) responses (Giusti et al., 2011). Reflex changes in HR were quantified and plotted as changes in heart rate over changes in mean arterial pressure ($\Delta\text{HR}/\Delta\text{MAP}$, beats per minute/mmHg). Data were analyzed by linear regression using Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and the slope of linear regression provided baroreflex gain for each animal. Also, spontaneous baroreceptor reflex sensitivity (SBRS) was evaluated as previously described (Braga et al., 2008; Fazan et al., 2008) using the sequence method. A baroreflex sequence was defined as a sequence of at least four heart beats in which both systolic arterial pressure and pulse interval increased (up sequences) or decreased (down sequences). The gain of the baroreflex response was calculated and expressed as beats per minute/mmHg. Tracings were analyzed using HemoLab software (kindly provided by Dr. Harald Stauss, University of Iowa, version 9.3). The absolute values for DAP and SAP over which the spontaneous baroreflex was assessed were, respectively (in mmHg): sham + vehicle: 111 ± 12 and 141 ± 4; sham + sildenafil: 104 ± 7 and 143 ± 9; 2K1C + vehicle: 152 ± 6 and 209 ± 10; 2K1C + sildenafil: 117.5 ± 4 and 177 ± 4.

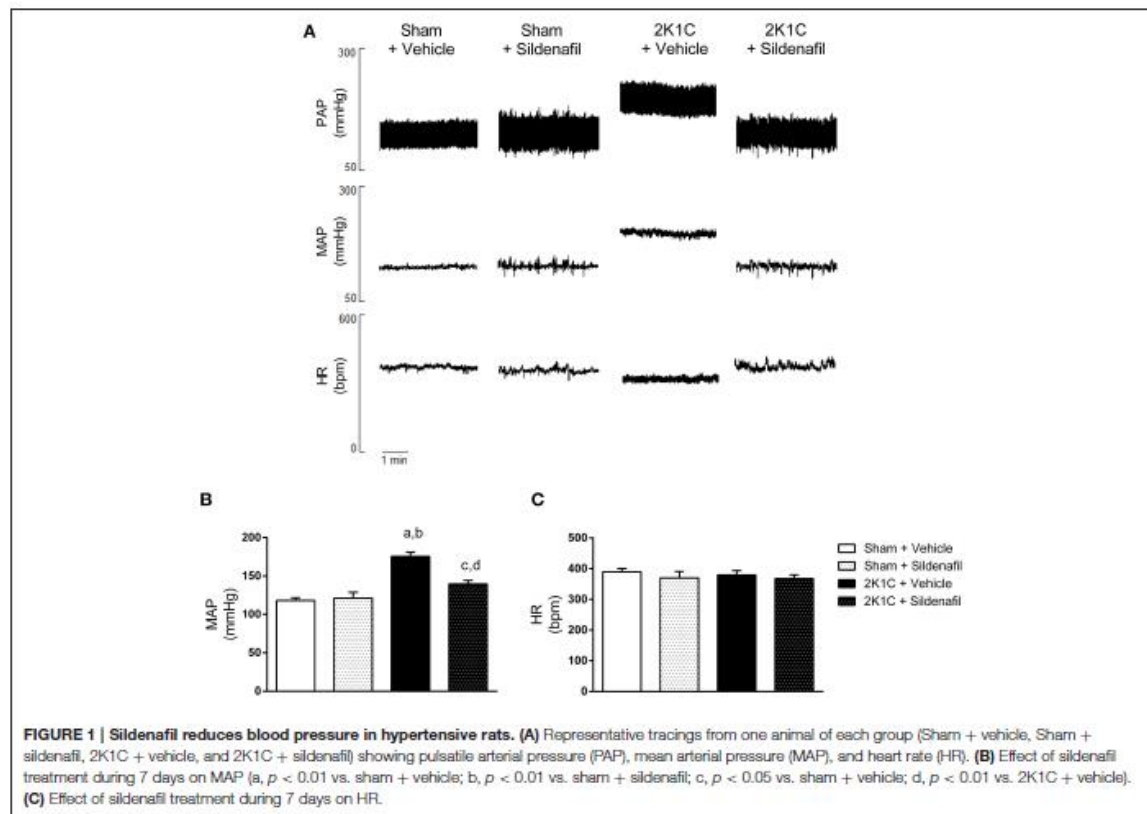
Evaluation of Autonomic Control of Heart Rate

Autonomic function was assessed in conscious animals (Botelho-Ono et al., 2011; Xia et al., 2013). Autonomic blockade was performed to evaluate the contribution of sympathetic and parasympathetic nervous system to heart rate control. Changes in

heart rate after the injection of propranolol (β -blocker, 5 mg/Kg, i.v.) or atropine (muscarinic receptor blocker, 4 mg/Kg, i.v.) were calculated and expressed as ΔHR . Variation in mean arterial pressure (ΔMAP) was also measured. Each drug administration was randomly chosen and separated from each other by an interval of at least 3 h on the same day. The first autonomic blockade was performed after MAP and HR had returned to baseline values from baroreflex studies (15 min). To assure that there was no interference of baroreflex drugs or the first autonomic blockage on autonomic responses, values for MAP and HR prior to baroreflex, prior to the first autonomic drug and prior to the second autonomic drug were provided in Table 2. No differences were found among treatments within the groups.

Oxidative Stress Assay

After the blood pressure recording experiments, blood was collected through the venous catheter and centrifuged at 200 g, 4°C, during 15 min. Serum samples were collected for thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay. The concentration of malondialdehyde (MDA), an end product of lipid peroxidation, was measured as an indicative of oxidative stress. In this assay, MDA reacts with thiobarbituric acid to produce a red-colored complex. Briefly, 400 μL of perchloric acid (7%) was added to 250 μL serum, mixed and centrifuged at 600 g, 4°C, during 20 min. The supernatant was collected, added to 400 μL of thiobarbituric acid (0.6%), heat at 60°C during 1 h and read at 532 nm. A standard curve of MDA was constructed and the results were expressed as nmol of MDA/mL.



Kidney and Heart Weight

After the experiments animals were euthanized with an overdose of thiopental (200 mg/Kg). Kidneys and heart were collected, cleaned from connective tissue and weighed.

Statistical Analyses

All results are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical comparisons among groups were performed by *t*-test or one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* when appropriate. Statistical analyses were performed using Prism 6 and the differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Body and Organs Weights

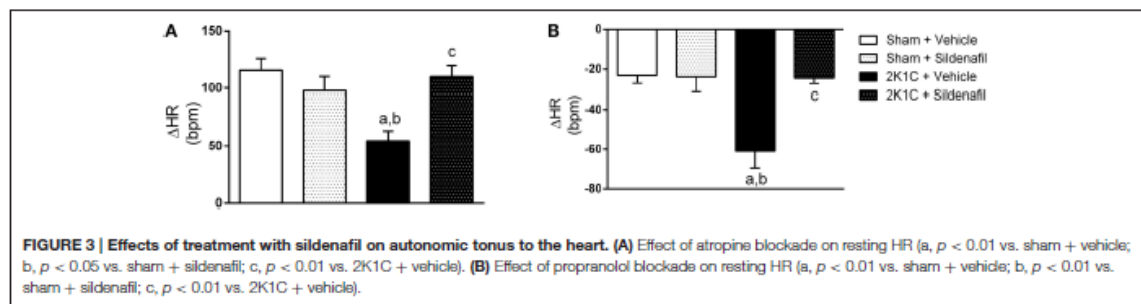
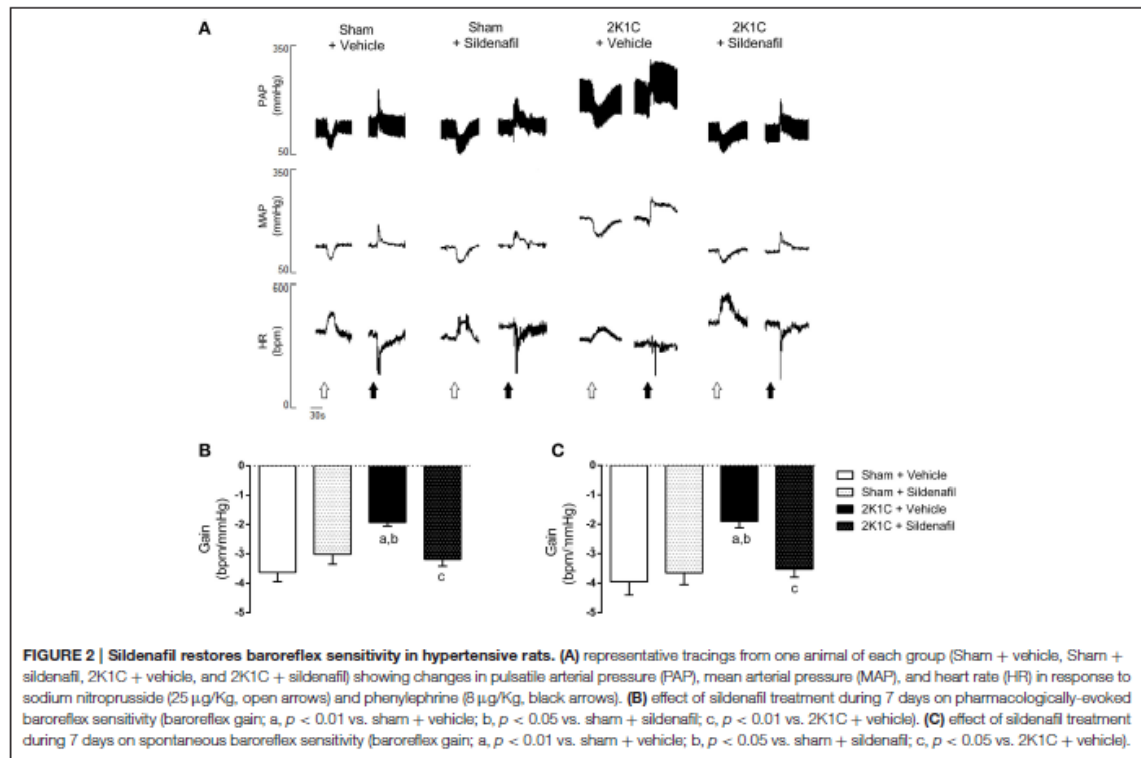
As shown in Table 1, animals from group sham + sildenafil were smaller than others. Considering that, organ weights were corrected by body weight. Clipped kidney from both renovascular hypertensive groups showed atrophy, as demonstrated by the reduction in right kidney weight/body weight ratio in relation to the other kidney in the same group. No differences were observed in left kidney weight/body weight ratio nor heart weight/body weight ratio regarding the induction of hypertension or treatment with sildenafil. Absolute values for organ weights were also provided in Table 1.

Sildenafil Treatment Decreases Blood Pressure in Hypertensive Rats

The results of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) are summarized in Figure 1. Figure 1A shows representative tracings of pulse arterial pressure (PAP), MAP, and HR from one animal of each studied group. As expected, MAP was increased in 2K1C + vehicle animals when compared with sham + vehicle (175 ± 6 vs. 118 ± 3 mmHg, $p < 0.01$; Figure 1B). Sildenafil treatment reduced MAP when compared to non-treated hypertensive animals (139 ± 5 vs. 175 ± 6 mmHg, $p < 0.01$; Figure 1B). The administration of sildenafil to sham animals did not significantly modify MAP (121 ± 7 vs. 118 ± 3 mmHg). Conversely, HR was not different among all four groups (Figures 1A,C).

Sildenafil Treatment Improves Baroreflex Sensitivity in Hypertensive Rats

The representative tracings of changes in blood pressure and heart rate after the administration of vasoactive drugs and baroreflex gain are shown in Figures 2A,B. Vehicle-treated hypertensive animals presented a reduction in baroreflex gain when compared with sham + vehicle rats (-1.93 ± 0.12 vs. -3.63 ± 0.31 bpm/mmHg, $p < 0.01$; Figure 2B). The treatment of hypertensive rats with sildenafil for 7 days was



efficient in improving the baroreflex gain (-3.18 ± 0.23 vs. -1.93 ± 0.12 bpm/mmHg, $p < 0.01$). These results were similar in SBRS (Figure 2C). Hypertensive animals presented reduced SBRS when compared with sham + vehicle animals (-1.90 ± 0.22 vs. -3.95 ± 0.46 bpm/mmHg, $p < 0.01$) and the treatment restored SBRS (-3.51 ± 0.29 bpm/mmHg vs. 2K1C + vehicle, $p < 0.05$). In both spontaneous and drug-induced baroreflex activation, treatment of normotensive rats did not modify baroreflex sensitivity (-3.65 ± 0.40 and -3.01 ± 0.33 bpm/mmHg, respectively, $p > 0.05$). Values for SBRS and drug-induced baroreflex gain were not different within groups.

Treatment with Sildenafil for 7 Days Restores Autonomic Imbalance in Hypertensive Rats

To test whether the treatment was efficient in correcting autonomic imbalance in 2K1C animals, sympathetic, and vagal tone to the heart were measured as the Δ HR after pharmacological blockade with propranolol and atropine (Figure 3). Cardiac sympathetic drive was increased in 2K1C + vehicle group when compared with non-treated sham rats (-60.9 ± 8 bpm vs. -23 ± 4 bpm, $p < 0.01$). Moreover, cardiac vagal tone was reduced in hypertension (54.7 ± 8 vs. 115.8 ± 10 bpm, $p < 0.01$). Treatment with sildenafil during 7

days normalized sympathetic (-24.5 ± 3 bpm, $p < 0.01$) and vagal tone (110 ± 9 bpm, $p < 0.01$) in 2K1C hypertension. No differences were found in sham + sildenafil group when compared to sham + vehicle. Changes in MAP after adrenergic blockade with propranolol followed the same pattern as HR (-34.6 ± 2 mmHg in sham + vehicle vs. -60.4 ± 6 mmHg in 2K1C + vehicle, $p < 0.01$ and -36.5 ± 3 mmHg in 2K1C + sildenafil, $p < 0.01$ vs. 2K1C + vehicle). No differences were observed in sham + sildenafil. Regarding muscarinic blockade with atropine, no differences were found in Δ MAP in all groups. In addition, SBRS was evaluated before and after autonomic blockade, as presented in Table 3. No differences were found in SBRS after atropine or propranolol blockade within groups and between different groups.

Sildenafil Treatment Reduces Oxidative Stress in Hypertensive Rats

The quantification of MDA, a final product of lipid peroxidation, is summarized in Figure 4. An increase in MDA concentration of about 30% was observed in non-treated 2K1C animals when compared with controls (1.67 ± 0.08 vs. 1.29 ± 0.06 nmol/mL, $p < 0.05$). Sildenafil treatment given to 2K1C rats for 7 days was able to reduce MDA levels when compared to non-treated hypertensive rats (1.04 ± 0.07 vs. 1.67 ± 0.08 nmol/mL, $p < 0.05$). Treatment of sham animals with sildenafil did not modify this parameter.

TABLE 3 | Values of spontaneous baroreflex gain before and after autonomic blockade.

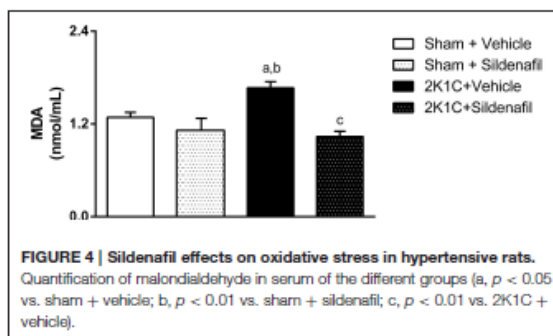
	Before blockade	After atropine	After propranolol
Sham + Vehicle	-3.95 ± 0.46	-3.52 ± 0.77	-3.73 ± 0.80
Sham + Sildenafil	-3.65 ± 0.40	-3.67 ± 0.63	-4.64 ± 0.42
2K1C + Vehicle	$-1.90 \pm 0.22^{a,b}$	-2.41 ± 0.25	-2.73 ± 0.53
2K1C + Sildenafil	-3.51 ± 0.29^c	-3.62 ± 0.77	-3.23 ± 0.35

Values were compared by one-way ANOVA for different groups under the same situation and by t-test for the same group before and after blockade.

^a $p < 0.01$ vs. sham + vehicle.

^b $p < 0.05$ vs. sham + sildenafil.

^c $p < 0.05$ vs. 2K1C + vehicle.



DISCUSSION

In this study we aimed to investigate whether oral treatment with a specific PDE5 inhibitor would improve baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. This study is part of a series of studies conducted by our research group, which evaluate the effects of sildenafil administration in animal models of cardiovascular diseases in a translational medicine perspective. Our novel findings are that 7 days of oral sildenafil administration to 2K1C rats were efficient in improving baroreflex control of HR and reestablish autonomic balance to levels of non-hypertensive animals. Furthermore, the treatment decreased serum lipid peroxidation, which is an indicative of oxidative stress. Taken together, these favorable effects of sildenafil treatment were accompanied by a significant reduction in BP in treated hypertensive rats. We propose that sildenafil could be considered as a potential alternative pharmacological approach to treat resistant hypertensive patients.

The efficacy of sildenafil treatment in reducing mean arterial pressure in 2K1C rats is remarkable (Figures 1A,B). This observation is in accordance with previous results by us in 2K1C mice (Dias et al., 2014a,b; Fahning et al., 2015) and by others in rats (Guimarães et al., 2013; Stegbauer et al., 2013). In normotensive rats, sildenafil did not modify blood pressure, which is in accordance with previously described (Ferreira-Melo et al., 2006; Rossoni et al., 2007). In humans, treatment of hypertensive patients with sildenafil during 15 days was able to reduce blood pressure in a degree similar to commonly used antihypertensive drugs, when given as monotherapy (Oliver et al., 2006). It is important to highlight that the reduction in BP elicited by sildenafil treatment was not accompanied by an increase in heart rate (Figure 1C). This was also observed in hypertensive patients that received sildenafil chronically (Oliver et al., 2006).

Previous studies in hypertensive rats found a slight decrease in total peripheral vascular resistance after chronic PDE5 inhibition, with no changes in HR. This suggested that the blood pressure-lowering effect of this drug did not trigger a reflex heart rate response (Ferreira-Melo et al., 2006). This observation is crucial because one concern of sildenafil chronic administration is the potential sympathetic activation, which could limit or blunt BP-lowering effect (Taddei and Ghiadoni, 2006). Although it was described that intracerebroventricular and intrathecal injection of sildenafil acutely increased blood pressure and lumbar sympathetic activity in rats (Fazan et al., 2008; Bombarda et al., 2011) and that, in humans, a single dose of sildenafil increased sympathetically-mediated vascular tone and norepinephrine plasma levels (Dopp et al., 2013), these results are still controversial. Different clinical studies support the idea that orally administered sildenafil does not increase sympathetic activity in humans (Taddei and Ghiadoni, 2006; Stirban et al., 2009). In the present work we observed that the treatment did not increase sympathetic drive to the heart (Figure 3B). On the contrary, 2K1C + sildenafil animals showed reduced sympathetic drive to the heart when compared with non-treated hypertensive animals.

One important finding from the present work is that sildenafil was efficient in restoring both spontaneous and drug-induced baroreflex sensitivity (Figure 2), which was impaired in 2K1C rats, as previously described (Botelho-Ono et al., 2011; Queiroz et al., 2012). Although the adaptation of Oxford method using single doses of SNP and PHE to elicit drug-induced baroreflex sensitivity may not be the most adequate approach to address baroreflex function, this method is well-accepted in the literature (Braga et al., 2008; Botelho-Ono et al., 2011; Monteiro et al., 2012; Alves et al., 2015). The main limitation of using single bolus doses for vasoactive drugs to evaluate baroreflex function is that it is not possible to build a complete sigmoid curve, which would be more informative. In addition, spontaneous baroreflex was evaluated during different baseline values for each group. This might affect interpretation of the data since each group may be on different parts of the baroreflex curve. However, regardless of the point in the baroreflex curve, our data regarding drug-induced baroreflex sensitivity is supported by the spontaneous baroreflex data, both showing that sildenafil improves baroreflex function in 2K1C rats. It is important to highlight that differences in SBRS were not apparent between groups after autonomic blockade. This can be explained by the fact that, under autonomic blockade, the sequence technique becomes less accurate in estimating baroreflex gain (Stauss et al., 2006).

Nowadays, it is well-accepted that the mechanisms underlying impaired baroreflex control of blood pressure in hypertension involve, at least in part, Ang II-mediated increase in oxidative stress along the axis formed by subfornical organ, paraventricular nucleus of the hypothalamus and rostral ventrolateral medulla (SFO-PVN-RVLM; Braga et al., 2011; de Queiroz et al., 2013). Sildenafil was shown to interfere in renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) during hypertension. Fourteen-days treatment of 2K1C animals with sildenafil resulted in reduction of Ang II in clipped kidney and increasing in Ang 1–7 in kidney and plasma (Dias et al., 2014a,b). Ang 1–7 is a product of the cleavage of Ang II by ACE2. It acts in a G-coupled receptor (Mas receptor) and has opposite effects when compared with Ang II (Santos et al., 2013). Although it was not directly measured in the present work, we cannot rule out the possibility that sildenafil treatment decreases RAAS signaling cascades in brain regions involved in cardiovascular control such as SFO-PVN-RVLM axis.

Interestingly, Aboutabl and colleagues showed that chronic inhibition of PDE5 reduced blood pressure in NO-deficient rats and increased plasma nitrite/nitrate and cGMP levels, suggesting that sildenafil treatment could restore, at least in part, NO/cGMP pathway in this model (Aboutabl et al., 2008). It is important to highlight that oxidative stress and excessive production of reactive oxygen species (ROS) are involved in the decreased bioavailability of NO due to reaction with superoxide anions to form peroxynitrite (Touyz, 2004). It is well-known that ROS and NO play a crucial regulatory role in neurotransmission in important brain areas of cardiovascular control (Kishi et al., 2001; Kishi and Hirooka, 2012; Nishihara et al., 2012a,b). It was previously shown by our group that, in addition to its classic mechanism of action, sildenafil is also capable to increase

NO bioavailability in aorta and mesenteric arteriolar cells (Dias et al., 2014a; Leal et al., 2015). If the same occurs in brain, this could explain the amelioration in autonomic imbalance promoted by sildenafil treatment in hypertensive rats (Figure 3). Treated 2K1C animals showed decrease in sympathetic and increase in parasympathetic tone to the heart. The lack of direct measurement of sympathetic nerve activity is a limitation of the study. Whether the amelioration of baroreflex is a cause or a consequence of reduced blood pressure in treated animals is not clear. Also, we cannot rule out the possibility that end organ responses could be different across groups and contribute to responses observed. However, in a translational perspective, the main goal of any antihypertensive therapy is to reduce arterial blood pressure, which was achieved by the treatment in the present work.

In the present study we found that PDE5 inhibition decreased serum lipid peroxidation, a marker of systemic oxidative stress. Increase in serum MDA is associated with increased oxidative stress in RVLM and PVN in 2K1C rats (Campos et al., 2011). The observed antioxidant effect of sildenafil is in accordance with previous investigations by us (Balarini et al., 2013; Rodrigues et al., 2013; Dias et al., 2014b; Fahning et al., 2015) and by others (Koupparis et al., 2005; Shukla et al., 2005; Schäfer et al., 2008; Bivalacqua et al., 2009; Guimarães et al., 2013) in different tissues. We believe that the amelioration of baroreflex sensitivity is directly involved in reducing ROS, since different works from our group (Nunes et al., 2010; Guimarães et al., 2012; Monteiro et al., 2012; Queiroz et al., 2012; Alves et al., 2015) and others (Nishi et al., 2010b, 2013) support the idea that antioxidant treatment with natural or synthetic molecules can enhance baroreflex gain in experimental hypertension. Oxidative stress along SFO-PVN-RVLM pathway is involved in the decreased baroreflex control of blood pressure during hypertension (Braga et al., 2011). Considering that sildenafil can cross the blood-brain barrier and act centrally (Raja and Nayak, 2004), our next step is to investigate whether chronic inhibition of PDE5 with sildenafil centrally decreases oxidative stress in key brain areas involved in cardiovascular control and sympathetic tone. Although it was demonstrated that PDE5 inhibition can decrease oxidative stress due to reduction in the expression of important proteins in the ROS-production cascades (Schäfer et al., 2008), information about similar results in central nervous system is not available yet.

Our findings suggest that right renal artery clipping was efficient in inducing renovascular hypertension (Figure 1). The reduction in right kidney mass was confirmed by the reduction in right kidney weight/body weight ratio in both 2K1C groups. Sildenafil treatment did not modify this parameter (Table 1). Although previous results from our group in 2K1C mice demonstrated that PDE5 chronic inhibition was able to reduce clipped kidney atrophy (Dias et al., 2014a,b), this difference is probably due to the fact that the treatment started 14 days after renal artery clipping, when renovascular hypertension is still developing and is not yet fully established (Navar et al., 1998). Although final body weight was different in sham + sildenafil group, that does not seem to be an effect of the treatment, since it was not observed in 2K1C + sildenafil group nor described in the literature.

In conclusion, this is the first study to show that inhibition of PDE5 is capable to improve baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. This improvement is associated with correction of autonomic imbalance in 2K1C rats. It was also documented that sildenafil treatment was efficient in reducing systemic oxidative stress and reducing blood pressure in treated animals. This study reinforces the concept that chronic administration of PDE5 inhibitors could be useful in normalizing blood pressure in resistant patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, RA, and AO carried out the experiments, acquisition and analyses of data and drafted the manuscript. JC and MF participated in the supervision of the experiments and critically revised the manuscript. VB participated in the study's design

and supervision and in the critical revision of the manuscript. CB conceived the study, supervised and participated in the acquisition and analyses of data and drafted the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant numbers 472133/2013-6 and 304772/2014-3 (VB) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) for funding support. In addition, the authors thank Dr. Harald Stauss for the valuable help in using HemoLab Software, Crispim Duarte for expert care of the animals and Sara Alves Lucena Madeiro and Thyago Queiroz for technical support.

REFERENCES

- Aboutabl, M. E., Raafat, M., Maklad, Y. A., Kenawy, S. A., and El Din, A. G. (2008). Sildenafil augments the beneficial hemodynamic and histopathological effects of amlodipine in nitric oxide-deficient hypertensive rats: role of nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Pharmacol. Res.* 57, 456–463. doi: 10.1016/j.phrs.2008.05.003
- Alves, N. F. B., Porpino, S. K. P., Monteiro, M. M. O., Gomes, E. R. M., and Braga, V. A. (2015). Coconut oil supplementation and physical exercise improves baroreflex sensitivity and oxidative stress in hypertensive rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 400, 393–400. doi: 10.1139/apnm-2014-0351
- Balarini, C. M., Leal, M. A., Gomes, I. B. S., Pereira, T. M. C., Gava, A. L., Meyrelles, S. S., et al. (2013). Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J. Transl. Med.* 11:3. doi: 10.1186/1479-5876-11-3
- Bivalacqua, T. J., Sussan, T. E., Gebeska, M. A., Strong, T. D., Berkowitz, D. E., Biswal, S., et al. (2009). Sildenafil inhibits superoxide formation and prevents endothelial dysfunction in a mouse model of secondhand smoke induced erectile dysfunction. *J. Urol.* 181, 899–906. doi: 10.1016/j.juro.2008.10.062
- Bombarda, G., Sabino, J. P. J., Silva, C. A. A., Fazan, R., Salgado, M. C. O., and Salgado, H. C. (2011). Role of cGMP and cAMP in the hemodynamic response to intrathecal sildenafil administration. *Clinics* 66, 1407–1412. doi: 10.1590/S1807-59322011000800017
- Botelho-Ono, M. S., Pina, H. V., Sousa, K. H. F., Nunes, F. C., Medeiros, I. A., and Braga, V. A. (2011). Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Auton. Neurosci.* 159, 38–44. doi: 10.1016/j.autneu.2010.07.025
- Braga, V. A., Burmeister, M. A., Sharma, R. V., and Davisson, R. L. (2008). Cardiovascular responses to peripheral chemoreflex activation and comparison of different methods to evaluate baroreflex gain in conscious mice using telemetry. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R1168–R1174. doi: 10.1152/ajpregu.90375.2008
- Braga, V. A., Medeiros, I. A., Ribeiro, T. P., França-Silva, M. S., Botelho-Ono, M. S., and Guimarães, D. D. (2011). Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44, 871–876. doi: 10.1590/S0100-879X2011007500088
- Campagnaro, B. P., Gava, A. L., Meyrelles, S. S., and Vasquez, E. C. (2012). Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. *Int. J. Hypertens.* 2012:968123. doi: 10.1155/2012/968123
- Campos, R. R., Oliveira-Sales, E. B., Nishi, E. E., Boim, M. A., Dolnikoff, M. S., and Bergamaschi, C. T. (2011). The role of oxidative stress in renovascular hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38, 144–152. doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05437.x
- Carey, R. M. (2013). Resistant hypertension. *Hypertension* 61, 746–750. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00601
- Chokshi, N. P., Grossman, E., and Messerli, F. H. (2013). Blood pressure and diabetes: vicious twins. *Heart* 99, 577–585. doi: 10.1136/heartjnl-2012-302029
- de Queiroz, T. M., Monteiro, M. M. O., and Braga, V. A. (2013). Angiotensin-II-derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: new perspectives. *Front. Physiol.* 4:105. doi: 10.3389/fphys.2013.00105
- Dias, A. T., Cintra, A. S., Frossard, J. C., Palomino, Z., Casarini, D. E., Gomes, I., et al. (2014a). Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *J. Transl. Med.* 12:250. doi: 10.1186/s12967-014-0250-x
- Dias, A. T., Rodrigues, B. P., Porto, M. L., Gava, A. L., Balarini, C. M., Freitas, F. P. S., et al. (2014b). Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *J. Transl. Med.* 12:35. doi: 10.1186/1479-5876-12-35
- Dopp, J. M., Agapitov, A. V., Sinkey, C. A., Haynes, W. G., and Phillips, B. G. (2013). Sildenafil increases sympathetically mediated vascular tone in humans. *Am. J. Hypertens.* 26, 762–769. doi: 10.1093/ajh/hpt018
- Fahning, B., Dias, A. T., Oliveira, J. P., Gava, A. L., Porto, M. L., Gomes, I. B., et al. (2015). Sildenafil Improves Vascular Endothelial Structure and Function in Renovascular Hypertension. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 823–831. doi: 10.2174/1389201016666150610161330
- Faselis, C., Doumas, M., and Papademetriou, V. (2011). Common secondary causes of resistant hypertension and rational for treatment. *Int. J. Hypertens.* 2011:236239. doi: 10.4061/2011/236239
- Fazan, R., Huber, D. A., Silva, C. A. A., Dias da Silva, V. J., Salgado, M. C. O., and Salgado, H. C. (2008). Sildenafil acts on the central nervous system increasing sympathetic activity. *J. Appl. Physiol.* 104, 1683–1689. doi: 10.1152/japplphysiol.01142.2007
- Ferreira-Melo, S. E., Yugar-Toledo, J. C., Coelho, O. R., De Luca, I. M., Tanus-Santos, J. E., Hyslop, S., et al. (2006). Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* 542, 141–147. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.04.039
- Giusti, M. F., Sato, M. A., Cardoso, L. M., Braga, V. A., and Colombari, E. (2011). Central antioxidant therapy inhibits parasympathetic baroreflex control in conscious rats. *Neurosci. Lett.* 489, 115–118. doi: 10.1016/j.neulet.2010.11.077
- Goldblatt, B. Y. H., Lynch, J., Ramon, F. P., and Summerville, W. W. (1934). Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med.* 59, 347–379. doi: 10.1084/jem.59.3.347
- Grassi, G., Mark, A., and Esler, M. (2015). The sympathetic nervous system alterations in human hypertension. *Circ. Res.* 116, 976–991. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303604
- Guimarães, D., Carvalho, C., and Braga, V. A. (2012). Scavenging of NADPH oxidase-derived superoxide anions improves depressed baroreflex sensitivity in

- spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 373–378. doi: 10.1111/j.1440-1681.2012.05679.x
- Guimarães, D. A., Rizzi, E., Ceron, C. S., Pinheiro, L. C., Gerlach, R. F., and Tanus-Santos, J. E. (2013). Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biol.* 1, 578–585. doi: 10.1016/j.redox.2013.11.004
- Irigoyen, M. C., and Krieger, E. M. (1998). Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31, 1213–1220. doi: 10.1590/S0100-879X1998000900015
- Kishi, T., and Hirooka, Y. (2012). Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. *Front. Physiol.* 3:335. doi: 10.3389/fphys.2012.00335
- Kishi, T., Hirooka, Y., Sakai, K., Shigematsu, H., Shimokawa, H., and Takeshita, A. (2001). Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. *Hypertension* 38, 896–901.
- Koupparis, A. J., Jeremy, J. Y., Muzaffar, S., Persad, R., and Shukla, N. (2005). Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47phox NAD(P)H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU Int.* 96, 423–427. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05643.x
- Leal, M. A., Balarini, C. M., Dias, A. T., Porto, M. L., Gava, A. L., Pereira, T. M. C., et al. (2015). Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: the beneficial effects of sildenafil. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16, 517–530. doi: 10.2174/138920101606150407113458
- Monteiro, M. M. O., França-Silva, M. S., Alves, N. F. B., Porpino, S. K. P., and Braga, V. A. (2012). Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Molecules* 17, 12997–13008. doi: 10.3390/molecules171112997
- Navar, L. G., Zou, L., Von Thun, A., Tarnag Wang, C., Imig, J. D., and Mitchell, K. D. (1998). Unraveling the mystery of goldblatt hypertension. *News Physiol. Sci.* 13, 170–176.
- Nishi, E. E., Bergamaschi, C. T., Oliveira-Sales, E. B., Simon, K. A., and Campos, R. R. (2013). Losartan reduces oxidative stress within the rostral ventrolateral medulla of rats with renovascular hypertension. *Am. J. Hypertens.* 26, 858–865. doi: 10.1093/ajh/hpt037
- Nishi, E. E., Campos, R. R., Bergamaschi, C. T., de Almeida, V. R., and Ribeiro, D. A. (2010a). Vitamin C prevents DNA damage induced by renovascular hypertension in multiple organs of Wistar rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 29, 593–599. doi: 10.1177/0960327109358267
- Nishi, E. E., Oliveira-Sales, E. B., Bergamaschi, C. T., Oliveira, T. G. C., Boim, M. A., and Campos, R. R. (2010b). Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. *Am. J. Hypertens.* 23, 473–480. doi: 10.1038/ajh.2010.11
- Nishihara, M., Hirooka, Y., Kishi, T., and Sunagawa, K. (2012a). Different role of oxidative stress in paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla in cardiovascular regulation in awake spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 30, 1758–1765. doi: 10.1097/HJH.0b013e32835613d7
- Nishihara, M., Hirooka, Y., Matsukawa, R., Kishi, T., and Sunagawa, K. (2012b). Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 30, 97–106. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834e1df4
- Nunes, F. C., Ribeiro, T. P., França-Silva, M. S., Medeiros, I. A., and Braga, V. A. (2010). Superoxide scavenging in the rostral ventrolateral medulla blunts the pressor response to peripheral chemoreflex activation. *Brain Res.* 1351, 141–149. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.001
- Oliver, J. J., Melville, V. P., and Webb, D. J. (2006). Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. *Hypertension* 48, 622–627. doi: 10.1161/01.HYP.0000239816.13007.c9
- Oparil, S., and Schmieder, R. E. (2015). New approaches in the treatment of hypertension in metabolic diseases. *Circ. Res.* 116, 1074–1095. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303603
- Palit, V., and Eardley, I. (2010). An update on new oral PDE5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction. *Nat. Rev. Urol.* 7, 603–609. doi: 10.1038/nrurol.2010.165
- Queiroz, T. M., Guimarães, D. D., Mendes-Junior, L. G., and Braga, V. A. (2012). α -lipoic acid reduces hypertension and increases baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Molecules* 17, 13357–13367. doi: 10.3390/molecules171113357
- Raja, S. G., and Nayak, S. H. (2004). Sildenafil: emerging cardiovascular indications. *Ann. Thorac. Surg.* 78, 1496–1506. doi: 10.1016/j.athoracsurg.2004.02.125
- Rodrigues, B. P., Campagnaro, B. P., Balarini, C. M., Pereira, T. M. C., Meyrelles, S. S., and Vasquez, E. C. (2013). Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 12:128. doi: 10.1186/1476-511X-12-128
- Rossoni, G., Manfredi, B., De Gennaro Colonna, V., Berti, M., Guazzi, M., and Berti, F. (2007). Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischemia-reperfusion damage in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 150, 567–576. doi: 10.1038/sj.bjp.0707131
- Santos, R. A. S., Ferreira, A. J., Verano-Braga, T., and Bader, M. (2013). Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J. Endocrinol.* 216, R1–R17. doi: 10.1530/joe-12-0341
- Schäfer, A., Fraccarollo, D., Pförtsch, S., Flierl, U., Vogt, C., Pfrang, J., et al. (2008). Improvement of vascular function by acute and chronic treatment with the PDE-5 inhibitor sildenafil in experimental diabetes mellitus. *Br. J. Pharmacol.* 153, 886–893. doi: 10.1038/sj.bjp.0707459
- Shukla, N., Jones, R., Persad, R., Angelini, G. D., and Jeremy, J. Y. (2005). 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.* 517, 224–231. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.05.012
- Stauss, H. M., Moffitt, J. A., Chapleau, M. W., Abboud, F. M., and Johnson, A. K. (2006). Baroreceptor reflex sensitivity estimated by the sequence technique is reliable in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H482–H483. doi: 10.1152/ajpheart.00228.2006
- Stegbauer, J., Friedrich, S., Potthoff, S. A., Broekmans, K., Cortese-Krott, M. M., Quack, I., et al. (2013). Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. *PLoS ONE* 8:e80674. doi: 10.1371/journal.pone.0080674
- Stirban, A., Laude, D., Elghozi, J. L., Sander, D., Agelink, M. W., Hiltz, M. J., et al. (2009). Acute effects of sildenafil on flow-mediated dilatation and cardiovascular autonomic nerve function in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 25, 136–143. doi: 10.1002/dmrr.921
- Taddei, S., and Ghiadoni, L. (2006). Phosphodiesterase 5 inhibition to treat essential hypertension: is this the beginning of the story? *Hypertension* 48, 546–548. doi: 10.1161/01.HYP.0000241985.54400.85
- Terrett, N. K., Bell, A. S., Brown, D., and Ellis, P. (1996). Sildenafil (Viagra), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 1819–1824. doi: 10.1016/0960-894X(96)00323-X
- Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44, 248–252. doi: 10.1161/01.HYP.0000138070.47616.9d
- Vongpatanasin, W. (2014). Resistant hypertension: a review of diagnosis and management. *JAMA* 311, 2216–2224. doi: 10.1001/jama.2014.5180
- Walker, D. K., Ackland, M. J., James, G. C., Muirhead, G. J., Rance, D. J., Wastall, P., et al. (1999). Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica* 29, 297–310. doi: 10.1080/004982599238687
- Xia, H., Sriramula, S., Chhabra, K. H., and Lazartigues, E. (2013). Brain angiotensin-converting enzyme type 2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. *Circ. Res.* 113, 1087–1096. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301811

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Cavalcanti, Alves, Oliveira, Cruz, França-Silva, Braga and Balarini. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.