

EFEITOS DO TRATAMENTO COM SILDENAFIL SOBRE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE CAMUNDONGOS HIPERTENSOS

THAÍS DE ANDRADE JACINTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO

Vitória-ES, Dezembro de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Laboratório de Fisiologia Translacional

**REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA
CANDIDATA AO TÍTULO DE MESTRE PELO PPGCF/CSS/UFES**

Nº DA MATRÍCULA: 2014130461

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado, intitulada "Efeitos do tratamento com Sildenafil sobre células tronco hematopoiéticas de camundongos hipertensos", apresentada publicamente pela aluna Thais de Andrade Jacinto, no dia 16 de dezembro de 2016, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida dissertação de Mestrado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 16 de dezembro de 2016.

**Profª Draª Silvana dos Santos Meyrelles
Orientadora**



**Profª Draª Fabiana Dayse Magalhães Siman Meira
Membro Interno**



**Profº Drº Marcelo Perim Baldo
Membro Externo**

Jacinto, Thaís de Andrade, 1992

Efeitos do tratamento com Sildenafil sobre as células tronco hematopoiéticas de camundongos hipertensos. [Vitória] 2016

xiv, 60 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2016)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

I. Biologia Molecular

I.PPGCF/UFES.....II.Efeitos do tratamento com Sildenafil sobre as células tronco hematopoiéticas de camundongos hipertensos.

Dedico aos meus pais, André e Zilda, e a minha irmã Julia por sempre me apoiarem e me darem um amor imensurável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me abençoar, me iluminar em todos os meus caminhos e escolhas e me trazer paz nos momentos mais difíceis e alegres que passei.

A minha família, por sempre estar ao meu lado, por sempre sorrir e chorar comigo, por sempre me motivar e acima de tudo por serem a base da minha vida.

A Prof.^a Silvana e Prof.^a Bianca, as duas orientadoras fantásticas que tive o prazer em ter, por me acolherem e me darem a oportunidade de conhecer esse mundo incrível da ciência, por toda aprendizagem e conhecimento transmitido, pelos puxões de orelhas, pelos conselhos e dicas. E principalmente, por confiarem em mim. Serei eternamente grata.

Ao Prof. Vasquez, por permitir a minha presença em seu laboratório. É muito gratificante conhecer e ficar perto de um grande mestre da ciência.

Aos meus grandes amigos e colegas do LFT: Jamila, Brunella, Gisele, Rossana, Brenna, Lais, Victor, Vinícios, João Victor, Marcos e Franciane. Obrigada por me aturarem durante todo esse tempo.

Muito Obrigada!

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da
imaginação” (John Dewey)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Hipertensão.....	17
1.1.1. Epidemiologia.....	17
1.1.2. Hipertensão Renovascular.....	18
1.2 Estresse Oxidativo.....	18
1.3 Células-tronco hematopoiéticas.....	19
1.4 Ciclo Celular.....	20
1.5 Sildenafil.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivo Especifico.....	26
4. METODOLOGIA.....	28
4.1 Animais Experimentais.....	28
4.2 Grupos Experimentais.....	28
4.3 Indução da Hipertensão Renovascular 2R1C.....	29
4.4 Tratamento dos Animais.....	29
4.5 Medidas Hemodinâmicas.....	30
4.6 Cateterização da artéria carótida e medida de PA.....	30
4.7 Coleta e cultura das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea.....	31
4.8 Quantificação das células na câmara de Neubauer.....	31
4.9 Imunofenotipagem.....	32
4.10 Análise do estresse oxidativo.....	33
4.11 Análise do ciclo celular.....	34
4.12 Análise da apoptose celular.....	34

4.13 Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	56

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e mantidos de pressão arterial. Esta condição está associada a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, como por exemplo, coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos; e também as alterações metabólicas, que aumentam o risco de disfunções cardiovasculares fatais e não fatais. O modelo clássico de hipertensão renovascular, 2 rins-1 clipe (2R1C), foi desenvolvido por Goldblatt em 1934, onde mostrou uma elevação substancial da pressão arterial de cães, este modelo patogênico serviu e serve como base para estudos subsequentes de hipertensão renovascular. Nosso laboratório tem mostrado que esta hipertensão é acompanhada de níveis elevados de estresse oxidativo, o qual é um fenômeno complexo definido como o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultante do aumento de sua produção ou da diminuição de sua degradação. As ROS desempenham papéis fisiológicos importantes uma vez que estão envolvidas em diversas funções celulares, como defesa contra patógenos, expressão gênica, senescência, apoptose e regulação do crescimento celular em diversos órgãos. Torna-se importante também estudar neste modelo a funcionalidade das células tronco, as quais possuem uma imensa responsabilidade sobre a manutenção tecidual e na homeostase do organismo. Todo o sistema hematopoiético é gerado a partir de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) que possui uma grande longevidade e um enorme potencial para auto renovação. Nossa proposta também visa investigar neste modelo de hipertensão o efeito do sildenafil, o qual é uma droga vasoativa amplamente utilizada no tratamento de disfunção erétil e hipertensão pulmonar. Ele é um inibidor potente e seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento com sildenafil sobre a produção citoplasmática de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células-tronco hematopoiéticas de camundongos com hipertensão renovascular. A hipertensão renovascular foi induzida pela colocação de um clipe de aço ao redor da artéria renal esquerda de camundongos machos (C57BL/6), pesando 23 g. Duas semanas após a indução da hipertensão, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: tratados com sildenafil [40 mg/kg/dia (VIAGRA), Pfizer, São Paulo, Brasil], via oral (Sil, n=10) ou veículo (2R1C, n= 10) por

2 semanas e comparados com o grupo controle (Sham, n= 10). Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados; rins e coração foram removidos para determinação de seus pesos e normalizados em relação ao comprimento da tíbia. As CTHs foram isoladas da medula óssea a partir de fêmures e tíbia. As célulastronco foram identificadas, quantificadas e análises da produção de radicais livres, apoptose e ciclo celular realizadas. Os dados estão expressos como média±EPM. A análise estatística foi realizada por meio de ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* de Tukey. Nossos dados indicam que animais hipertensos tiveram um aumento da produção de ânion superóxido e que o tratamento com sildenafil reverteu essa produção (Sham 1531±206 vs. 2R1C 1973±337* vs. Sil 1483±192[#]). Os níveis de peróxido de hidrogênio que também estavam aumentados tiveram sua produção diminuída com o tratamento com sildenafil (Sham 3805±237 vs. 2R1C 6562±456* vs. Sil 4447±395^{#&}). As espécies altamente reativas de oxigênio foram diminuídas com o tratamento (Sham 1653±303 vs. 2R1C 2529±196* vs. Sil 1611±252[#]). O número de células presentes na medula óssea caiu drasticamente nos animais hipertensos, mas essa situação foi revertida com o sildenafil (Sham $4,5 \times 10^6 \pm 1,1$ vs. 2R1C $2,4 \times 10^6 \pm 0,7^*$ vs. Sil $6,3 \times 10^6 \pm 1,7^{\#}$). O número de CTHs que sofreram apoptose também diminuíram com o tratamento, tendo uma melhora significativa inclusive comparado ao grupo controle, aumentando assim o número de células viáveis (Sham 59,3%±7,8 vs. 2R1C 46,7%±6* vs. Sil 80%±4,9^{#&}). Considerando a importância das células-tronco para a homeostase do organismo, nossos dados nos levam a sugerir o sildenafil como uma opção para o tratamento de CTHs prejudicadas pela hipertensão renovascular.

Palavras-chave: Hipertensão renovascular; Células-Tronco Hematopoiéticas; Estresse Oxidativo; Apoptose; Sildenafil

ABSTRACT

Arterial hypertension is a multifactorial clinical condition characterized by elevated and sustained high levels of blood pressure, which is also associated with functional/structural changes in target organs such as heart, brain, kidneys and blood vessels and in the metabolic changes that increase risk of fatal and nonfatal cardiovascular disorders. The classic model of renovascular hypertension, 2 Kidney-1 Clip (2K1C), was developed by Goldblatt in 1934. This model showed a substantial increase in blood pressure of dogs and has served for subsequent studies in renovascular hypertension. Reactive oxygen species (ROS) play important physiological role and are involved in diverse cellular functions such as defense against pathogens, gene expression, senescence, apoptosis, and regulation of cell growth. Our laboratory has shown that the renovascular hypertension accounts with the development of high levels of oxidative stress, resulting from ROS increased production or decreased degradation. It is well known that stem cells have an important role in tissue maintenance and homeostasis and can be affected by high levels of ROS. The entire hematopoietic system is generated from hematopoietic stem cells (HSCs) that has a long lifespan and a high potential for self-renewal. The focus of the present investigation is on the Sildenafil, which is a vasoactive drug commonly used in the treatment of erectile dysfunction and pulmonary hypertension. It is a potent and selective inhibitor of phosphodiesterase type 5 (PDE5). The aim of this study was to evaluate the effect of sildenafil treatment on intracytoplasmic production of ROS in hematopoietic stem cells of mice with renovascular hypertension. Renovascular hypertension was induced by placing a steel clip around the left renal artery of male mice (C57BL/6) weighing between 23-23.5g. Two weeks after the induction of hypertension, the animals were randomly divided into two groups: treated with sildenafil (40 mg/kg/day (VIAGRA Pfizer, Sao Paulo, Brazil), orally (Sil, n=10) or vehicle (2K1C, n=10) for 2 weeks and compared with the control group (Sham, n=10). At the end of treatment, animals were euthanized, the kidneys and hearts were removed and weighted for relative heart/tibia measurement. HSCs were isolated from bone marrow from femurs and tibiae. Cells were identified, quantified and intracytoplasmic production of free radicals, apoptosis and cycle cell were made. Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed

by one-way ANOVA followed by Tukey *post hoc* test. Results showed that 2K1C animals had an increase in superoxide anion production and the treatment with sildenafil prevented this increase (Sham 3805 ± 237 vs. 2R1C $6562 \pm 456^*$ vs. Sil $4447 \pm 395^{\#\&}$). The high levels of hydrogen peroxide, also decreased with treatment (Sham 3805 ± 237 vs. 2R1C $6562 \pm 456^*$ vs. Sil $4447 \pm 395^{\#\&}$). The same occurred with the highly reactive species of oxygen that were also decreased with treatment (Sham 1653 ± 303 vs. 2R1C $2529 \pm 196^*$ vs. Sil $1611 \pm 252^{\#}$). The number of cells present in the bone marrow has dropped significantly in hypertensive animals, this situation was prevented with sildenafil treatment (Sham $4,5 \times 10^6 \pm 1,1$ vs. 2R1C $2,4 \times 10^6 \pm 0,7^*$ vs. Sil $6,3 \times 10^6 \pm 1,7^{\#}$). The sildenafil treatment also significantly decreased the number of HSCs with apoptosis when compared to control group, increasing the number of viable cells (Sham $59,3\% \pm 7,8$ vs. 2R1C $46,7\% \pm 6^*$ vs. Sil $80\% \pm 4,9^{\#\&}$). Considering the HSCs importance to body homeostasis and based on the data of the present study, we suggest sildenafil as an option to treatment of damaged HSCs observed in renovascular hypertension.

Keywords: Renovascular hypertension; Hematopoietic stem cells, Oxidative stress, Apoptosis; Sildenafil

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pressão arterial e frequência cardíaca.

Tabela 2: Contagem de células da medula óssea na câmara de Neubauer.

Tabela 3: Níveis de apoptose das células tronco hematopoiéticas

Tabela 4: Fases do ciclo celular das células tronco hematopoiéticas

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Células-tronco hematopoiéticas

Figura 2: Histograma do ciclo celular

Figura 3: Citogramarepresentativo de apoptose

Figura4: Peso corporal final

Figura5: Peso seco do coração corrigido pelo valor da tíbia (mg/cm).

Figura 6: Peso seco do rim esquerdo

Figura 7: Peso seco do rimdireito

Figura8:Imunofenotipagem de CTHs damedula óssea

Figura 9: Níveis de ânion superóxido nas CTHs

Figura 10: Níveis de peróxido de hidrogênio nas CTHs

Figura 11: Níveis de espécies altamente reativas nas CTHs

Figura 12: Níveis de óxido nítrico nas CTHs.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

2R1C: 2 rins-1 clipe

cAMP: Monofosfato de adenosinacíclico

cGMP: Monofosfato de guanosina cíclico

CDKS: Cyclin-dependentkinases

CIO-: Hipoclorito

CTHs: Células-tronco hematopoiéticas

DAF: Diaminofluoresceína

DCF: Diacetato de diclorofluesceína

DHE: Dihidroetídeo

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECA: Enzima conversora de angiotensina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HPF: Hidroxifenilfluoresceína

O₂^{•-}: Ânion superóxido

O₂: Oxigênio

O₃: Ozônio

•OH: Radical hidroxila

NO: Óxido nítrico

ONOO⁻: Peroxinitrito

OMS: Organização Mundial da Saúde

PI: Iodeto de Propídeo

PDE5: Fosfodiesterase tipo 5

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

Introdução

1. Introdução

1.1 Hipertensão Arterial

1.1.1 Epidemiologia

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e mantidos de pressão arterial. Associa-se, frequentemente, com alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, como por exemplo, coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos; e também às alterações metabólicas, que aumentam o risco de disfunções cardiovasculares fatais e não fatais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

Dentre as doenças cardiovasculares, a HAS tem alta prevalência na população brasileira; sendo que aproximadamente 90% dos indivíduos hipertensos são considerados essenciais, ou seja, a etiologia da doença ainda não é conhecida. No ano de 2013, a prevalência de HAS referida na população de adultos residentes nas capitais brasileiras e no Distrito Federal foi de 24,1%. No Espírito Santo a prevalência foi de 20,6% (ANDRADE et al, 2015).

A patogênese da hipertensão essencial é, em grande parte, indefinida, multifatorial, e altamente complexa. Por outro lado, quando a etiologia da doença é conhecida, como é o caso do modelo proposto neste estudo, define-se a hipertensão como secundária, o que pode, portanto, direcionar o tratamento de acordo com a etiologia (OLIVEIRA-SALES, 2006).

1.1.2 Hipertensão Renovascular

De acordo com Khangura e colaboradores (2014), a hipertensão renovascular é uma condição secundária gerada pela estenose da artéria renal e/ou pode estar associada a doenças ateroscleróticas. Somente nos Estados Unidos cerca de 5% dos aproximadamente 75 milhões de adultos hipertensos, são acometidos com esse tipo de hipertensão.

Um dos modelos clássico de hipertensão renovascular, 2 rins-1 clipe (2R1C), foi desenvolvido por Goldblatt et al em 1934, esse modelo mostrou uma elevação substancial da pressão arterial de cães, cujo suprimento sanguíneo para os rins era

reduzido por meios da colocação de cliques de prata na artéria renal (FAZAN JR et al, 2001).

O modelo 2 rins-1 clipe (2R1C) é dependente de ativação contínua do sistema renina-angiotensina (SRA). O tempo de manutenção da pressão elevada e os níveis pressóricos atingidos dependem da espécie e do grau de estenose da artéria renal (DIAS AT, 2014).

Além disso, este modelo serviu como base para estudos subsequentes e demonstrou que uma lesão obstrutiva na artéria renal deve alcançar um nível crítico de 75% a 80% para produzir mudanças hemodinâmicas significantes do fluxo arterial.

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina corresponde a uma complexa rede hormonal, com papel crucial nos mecanismos que regulam tanto a pressão arterial como o balanço hidroeletrólítico do organismo, a visão clássica deste sistema tem como primeiro componente a renina (AIRES, 2012). Sabe-se que quando o fluxo sanguíneo renal diminui, renina é liberada pelas células justaglomerulares, que funcionam como mecanorreceptores e são encontradas, principalmente, na parede das arteríolas aferentes do aparato justaglomerular dos rins. A renina é uma enzima que atua sobre o angiotensinogênio plasmático, sintetizado principalmente pelo fígado, catalisando sua conversão em um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I, que possui pequena atividade vasoconstritora, insuficiente para causar mudanças significantes na função circulatória. Em seguida, dois aminoácidos são removidos da angiotensina I formando o octapeptídeo angiotensina II, potente vasoconstritor e efetor chave do sistema renina angiotensina (SRA). Esta conversão ocorre quase que inteiramente nos pulmões durante a passagem do sangue através dos capilares pulmonares e é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) que se encontra primariamente ligada ao endotélio e em concentrações particularmente elevadas nas células endoteliais da vasculatura pulmonar. Entretanto, atualmente sabe-se que os componentes do SRA são sintetizados e expressos em vários tecidos do organismo (CAMPAGNARO BP, 2012)

1.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um fenômeno complexo definido como o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultante do aumento de sua produção ou da diminuição de sua degradação (JONES, 2006). As ROS são pequenas moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio incluindo radicais livres, como ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), óxido nítrico (NO), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), hipoclorito (ClO^-) e peroxinitrito (ONOO^-), e também algumas moléculas que não são radicais livres, mas agentes oxidantes que podem ser facilmente convertidos em radicais, como ozônio (O_3), oxigênio *singlet* (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ROS desempenham papéis fisiológicos importantes uma vez que estão envolvidas em diversas funções celulares, tais como: defesa contra patógenos, expressão gênica, senescência, apoptose e regulação do crescimento celular (CAMPAGNARO BP, 2012).

Um grande número de pesquisas experimentais e clínicas mostra uma forte relação entre a hipertensão arterial e os radicais livres. Os radicais livres podem participar na hipertensão causando danos em órgãos-alvos através de várias maneiras (AMAT, 2014).

Nos anos recentes, pressão arterial alta e estresse oxidativo se tornaram o foco das pesquisas. O estresse oxidativo pode ser a causa, a consequência ou um fator potencializador para a hipertensão (ARAUJO e WILCOX, 2014).

Além dos danos aos órgãos alvos, o estresse oxidativo também pode causar danos ao DNA, causando oxidação de bases específicas ou *strand breaks*, conduzindo a uma instabilidade genômica e mudanças permanentes no material genético, levando a ageno toxicidade (RODRIGUES BP, 2013). Essa instabilidade genômica e mutações no DNA são observadas em doenças neurodegenerativas, câncer e envelhecimento. Além disso, é bem sabido que as espécies reativas de oxigênio afetam toda a sinalização do sistema renina-angiotensina nas células-tronco da medula óssea, as quais possuem participação fundamental na reparação tecidual (CAMPAGNARO et al, 2013)

1.4 Células-Tronco Hematopoiéticas

As células-tronco são responsáveis pela manutenção tecidual e homeostase do organismo. Assim sendo, essas células-tronco tem características evolutivas que oferecem proteção contra danos, permitindo a sobrevivência e repovoando os tecidos lesados em um curto prazo (LANE e SCADDEN, 2012).

Todo o sistema hematopoiético é gerado a partir de células-tronco hematopoiéticas (Figura 1) o qual possui uma grande longevidade e um alto potencial para auto renovação (MILYAVSKY, 2010). Estudos demonstraram, através de células-tronco dos melanócitos, que o dano ao DNA ocasiona um estresse genotóxico irreparável induzindo a diferenciação prematura em melanócitos maduros (MANDAL, 2012).

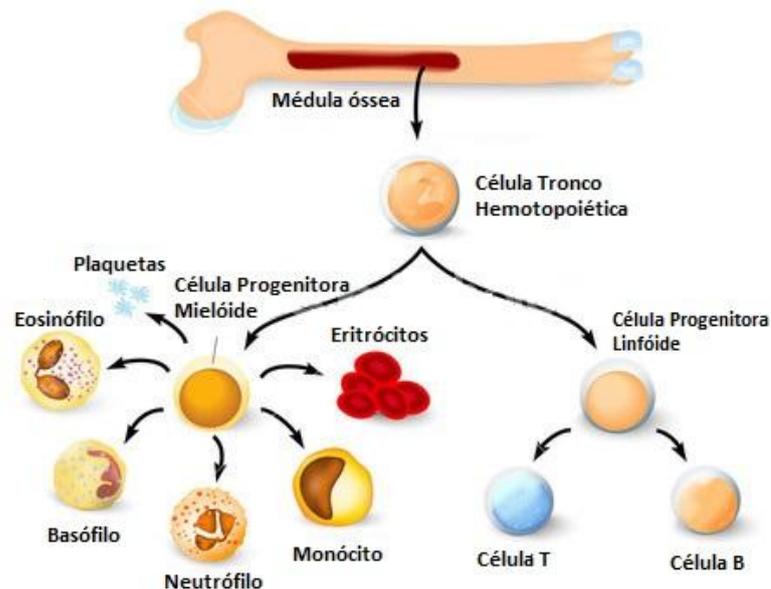


Figura 1: Cascata de diferenciação das células troncohematopoiéticas. Adaptado de: www.lookfordiagnosis.com

1.5 Ciclo Celular

Ciclo celular é um processo extremamente coordenado onde a progressão pelas fases do ciclo é regulada, de modo muito preciso, por uma rede bioquímica muito complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1, S, G2, M. Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os

processos de diferenciação, senescência e morte. O mau funcionamento dessas vias leva ao aparecimento e perpetuação de mutações e aberrações cromossômicas que favorecem ao aparecimento de diversas patologias, entre elas o câncer (SOUZA, 2011)

O ciclo celular envolve numerosas proteínas reguladoras que direciona a célula através de uma sequência específica de eventos que culmina na mitose e produção de duas células filhas. No centro destes processos estão as ciclinas dependentes de quinase (CDKs) e as ciclinas que regulam a progressão celular (SCHAFER,1998).

O ciclo celular pode ser morfológicamente subdividido em interfase que é composta por G1, S, G2 e a fase mitótica que inclui prófase, metáfase, anáfase e telófase. As fases G1 e G2 são os “*gaps*” que ocorrem entre dois pontos do ciclo celular: asíntese do DNA e a mitose. No primeiro “*gap*”, G1, a célula é preparada para a síntese do DNA, na fase S o DNA é sintetizado e no segundo “*gap*”, fase G2, a célula é preparada para a fase M (mitótica). A célula também possui a fase G0 que indica células que não estavam em ciclo, porém teriam o potencial para se dividir (SCHAFER,1998).

As células podem parar nos pontos de checagem ou “*checkpoints*” temporariamente para permitir que: o dano celular seja reparado, que ocorra dissipação de sinal de estresse celular exógeno ou para avaliação dos fatores de crescimento, hormônios ou nutrientes. As sinalizações dos “*checkpoints*” podem também resultar na ativação de mecanismos que conduzem à morte celular programada ou apoptose se o dano celular não for totalmente reparado (PIETENPOL, 2002).

Muitos estudos têm demonstrado que o ciclo celular pode ser parado em resposta ao estresse oxidativo. Alterações no estado redox também resultam em dificuldades na progressão da fase G1 a S bem como na parada da fase G2 (PARAVICINI e TOUZ, 2006).

1.6 Sildenafil

O sildenafil é uma droga vasoativa amplamente utilizada no tratamento da disfunção erétil e hipertensão pulmonar. É um inibidor potente e seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), enzima que degrada o GMPc, e pode ser encontrada nas células musculares lisas dos corpos cavernosos do pênis, de vasos periféricos arteriais e

venosos, bem como na circulação coronária e pulmonar, e também nas plaquetas (RODRIGUES, 2013).

Há evidências experimentais que o aumento intracelular de GMPc pode prevenir a indução do estresse oxidativo. Foi demonstrado que a atividade de enzimas antioxidantes aumenta depois da administração sistêmica do sildenafil. Além disso, o sildenafil apresenta efeitos cardio-protetivos e pode reduzir a apoptose e necrose em tecidos cardíacos após a isquemia-reperfusão (EBRAHIMI et al, 2009). De acordo com Rodrigues e cols. (2013) o tratamento com sildenafil em camundongos ateroscleróticos, reduziu o estresse oxidativo, resultando em diminuição do dano ao DNA nas células mononucleares sanguíneas e células do fígado.

Justificativa

2 Justificativa

É indiscutível a importância das células tronco para a manutenção e regeneração celular e tecidual. Entretanto em diferentes situações patofisiológicas, como por exemplo, na hipertensão arterial, essas células podem ter sua função comprometida, contribuindo para o mau funcionamento de diversos órgãos. Considerando que o sildenafil, um inibidor da PDE5, tem demonstrado efeitos antioxidantes em diversos órgãos, se faz necessário e importante realizar estudos visando avaliar a eficácia desta droga sobre a função das células tronco em modelos fisiopatológicos.

Objetivos

3 Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento com sildenafil sobre as células-troncohematopoiéticas de camundongos com hipertensão renovascular.

3.2. Objetivos Específicos

Em camundongos com hipertensão renovascular, verificar o efeito do tratamento com sildenafil sobre:

- Os parâmetros biológicos: pressão arterial, peso corporal, peso do coração e peso dos rins;
- O número de células presentes na medula óssea;
- O ciclo celular, apoptose e estresse oxidativo nas células hematopoiéticas

Metodologia

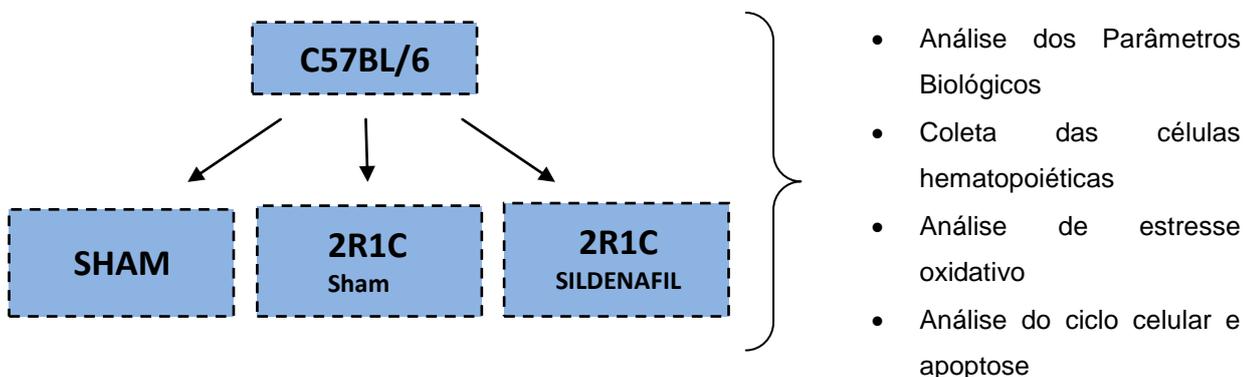
4. Metodologia

4.1. Animais experimentais

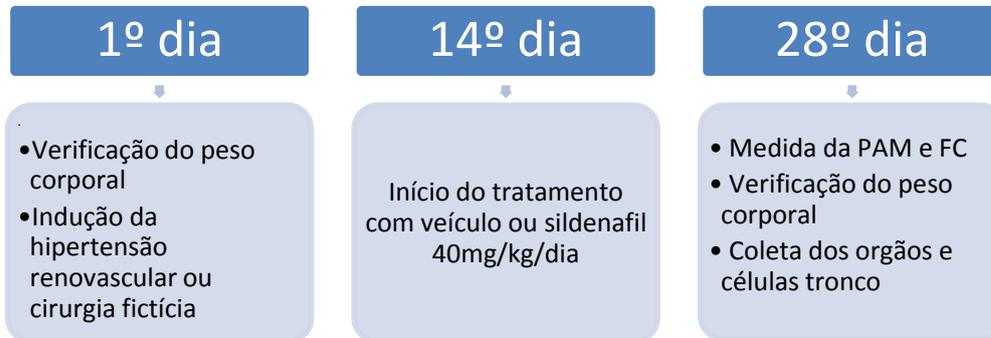
Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57Bl/6, pesando entre 23 e 23,5 gramas com aproximadamente 8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Fisiologia Translacional, pertencente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com garantia de serem animais isogênicos, ou seja, filhos de casais irmãos e, portanto, com o mínimo de variabilidade genética. Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas individuais colocadas em estantes ventiladas onde receberam água e ração *ad libitum* e também foi controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como a temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade (70%) do ambiente. Os aspectos éticos, a utilização e o manuseio experimental dos animais estava de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a *American Physiological Society* (APS). Este estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES), sob o nº 59/2014.

4.2. Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos experimentais (n=10 por grupo):



Os experimentos foram realizados de acordo o cronograma abaixo:



4.3. Indução da Hipertensão Renovascular 2R1C

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9,1 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a tricotomia no flanco esquerdo, foi realizada uma incisão para exposição do conteúdo da cavidade retro peritoneal. Com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A Brasil) a artéria renal esquerda foi isolada para a colocação de um clipe de aço em forma de “U” com 0,12mm de abertura (Exidel AS, Moutiter, Suíça), próximo à aorta dos animais do grupo 2R1C e 2R1C-SIL, para que o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a pressão de perfusão renal fosse reduzida. A camada muscular e a incisão cutânea foram suturadas, respectivamente, com catgut 4.0 e fio de seda 4.0. Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe. Os animais foram observados até se recuperarem da anestesia e estudados 28 dias após a indução da hipertensão.

4.4. Tratamento dos animais

O tratamento com veículo (água) ou sildenafil foi iniciado 14 dias após a indução da hipertensão renovascular e teve duração de 14 dias, este tempo de tratamento já é bastante consolidado em nosso laboratório, visto que após 14 dias de indução o animal já apresenta as características da hipertensão renovascular. Foi utilizado sildenafil (Pfizer, São Paulo, Brasil) na dose de 40 mg/kg/dia. A dose foi escolhida por se aproximar dos valores utilizados na prática clínica para o tratamento de

hipertensão pulmonar em humanos. Os animais Sham e 2R1C veículo receberam apenas o veículo (100 μ L de água) pelo mesmo período de tempo. Todos os tratamentos foram realizados por via oral (gavagem), sempre pelo mesmo administrador.

4.5. Medidas hemodinâmicas

Após 28 dias os animais foram novamente pesados, para obtenção do peso corporal final. No último dia do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o coração e os rins foram isolados e mantidos na estufa a 37°C por 24 horas para obtenção do peso seco. Para verificar a existência de hipertrofia cardíaca o peso do coração (g) foi dividido pelo comprimento da tíbia (cm).

4.6. Cateterização da artéria carótida e medida da PA

Para a medida da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC), 26 dias após a cirurgia, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina 91,0/9,1 mg/kg por via intraperitoneal para a introdução de um cateter na artéria carótida direita comum. Esse cateter consistia em uma cânula com 4 a 5 cm de comprimento (0,040 mmOD X 0,025 mm ID; Micro-Renathane; Braintree Science, USA) que foi esticada sobre ar aquecido até que sua extremidade tivesse com aproximadamente 300-500 μ m de diâmetro. As cânulas foram previamente preenchidas com solução salina isotônica contendo heparina (100U) e obstruídas com pinos de metal. Foi realizada uma incisão cervical nos animais que permitiu o acesso à artéria carótida, a qual foi isolada e teve suas extremidades amarradas com o auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica SA, modelo SM 2002, Belo Horizonte, MG, Brasil). Em seguida, o cateter foi inserido no lúmen da artéria através de uma pequena incisão, foi firmemente amarrado e exteriorizado na nuca dos animais com o auxílio de um trocater. Os registros da PAM e da FC foram realizados nos animais acordados e livres dentro das gaiolas, 48 horas após a colocação do cateter. Para o registro da PAM e da FC, o cateter foi conectado a um tubo de polietileno de aproximadamente 25 cm (PE 50; 0,023 mm ID X 0,038 mm OD; Clay-Adams, EUA). A extremidade livre deste tubo foi acoplada a um transdutor de pressão

(CobeLaboratories, EUA) previamente conectado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (Biopac System, Santa Barbara, CA, EUA).

4.7. Coleta e Cultura das células-tronco hematopoiéticas da medula óssea

Os animais foram anestesiados e levados para capela de fluxo laminar onde foi realizada a assepsia do animal e os fêmures e as tíbias removidos, assim como o excesso de músculo e tecido conjuntivo ao redor dos ossos. As epífises foram cortadas para exposição do canal medular e uma agulha de 26-gauge acoplada a uma seringa de plástico (1 mL) que foi inserida na cavidade medular para retirada da medula óssea através de “flush” utilizando meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Sigma) suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina; Gibco). Após a retirada da medula óssea, a mesma foi colocada em placas de cultura e levada para uma incubadora, depois de 3 dias foram coletadas as células hematopoiéticas. Após a coleta, as células foram transferidas para um tubo falcon para a centrifugação por 10 min à 2.600 rpm e ressuspensas com 1 ml de solução de congelamento e armazenadas em um freezer por 24 h, após esse período as células foram armazenadas à -80°C.

4.8. Quantificação de células na câmara de Neubauer

Este protocolo foi realizado objetivando utilizar sempre 10^6 de células nos estudos realizados por meio de citometria de fluxo e também para quantificar o número de células obtidas através da extração da medula óssea.

Para determinação do número de células obtidas, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão das células-tronco hematopoiéticas em PBS (Gibco). Em seguida, uma alíquota desta solução foi diluída 1:2 (v/v) em solução de Turck (ácido acético 2% com azul de metileno) para eliminar resíduos de hemácias das amostras e uma alíquota desta última solução foi novamente diluída 1:2 (v/v) em solução de azul de Tripano 0,4% para quantificação das células vivas. A solução (células/Turck/Tripano) foi homogeneizada e colocada em um lado da câmara de Neubauer para contagem com auxílio do microscópio óptico (Nikon Tsi) no aumento de 40X. As células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara

seguindo sempre a mesma direção e usando o esquema do “L” para que a mesma célula não fosse contada duas vezes. Portanto, as células que se encontraram sobre as linhas de baixo e da direita não foram contadas. A equação usada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1ml \times \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{4}, \text{ onde:}$$

QC → Quantidade de células por ml

FD → Fator de diluição (40x)

10^4 → Fator de correção da câmara de Neubauer

1ml → Volume da amostra

N° de células → Média do número de células contadas

4.9. Imunofenotipagem

Para a identificação e confirmação das células tronco hematopoiéticas, foi realizada imunofenotipagem, para a identificação de antígenos expressos na superfície celular. Antes de iniciar o protocolo, as células foram colocadas em cultura por 24 horas e, realizada uma imuno-depleção magnética, onde ocorre a marcação de células diferenciadas por meio de vários anticorpos: CD3c, CD11b, CD45, Ly-65, Ly-76 e TER 119, esses anticorpos marcam as células já diferenciadas e que não são de interesse do nosso estudo. O processo de imuno-depleção consiste em adicionar o coquetel com os anticorpos mencionados acima, deixar a amostra em repouso em uma temperatura de 6°C por 30 minutos, logo após, a amostra era colocada na posição horizontal em uma coluna magnética, onde as células que foram marcadas com o coquetel são atraídas, deixando assim as células não marcadas e que são de interesse do estudo, livres para que possam ser coletadas. Após a imuno-depleção magnética, as células coletadas foram marcadas com anticorpos que marcam os antígenos presentes nas superfícies das células hematopoiéticas: CD90, CD133, CD117 e Sca1.

4.10. Análise do estresse oxidativo

Para a análise dos níveis de ROS, foram utilizados marcadores para: ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) através do marcador dihidroetídeo (DHE); peróxido de hidrogênio através do marcador 2',7' – diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA); para biodisponibilidade de NO através do marcador diacetato de 4,5 – diaminofluoresceína (DAF-2D); e para espécies altamente reativas (ONOO/OH) através do marcador hidroxifenilfluoresceína (HPF). Os níveis de ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o $\text{O}_2\bullet^-$ formando etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm) (Sharikabadet *al.*, 2001). A oxidação do DHE é quantitativamente proporcional a concentração de $\text{O}_2\bullet^-$ na célula.

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também foram medidos por citometria defluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é produzida pela oxidação do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA é um éster, não-fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o DCFH-DA perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 formando o composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula. Portanto, a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de H_2O_2 na célula.

Para detecção e estimativa da biodisponibilidade do NO foi usado o marcador diacetato 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2D, 2mM), que na presença de NO, emite fluorescência de cor verde, cuja intensidade é proporcional a biodisponibilidade intracelular de NO. Este corante foi adicionado à suspensão de CTH's e incubado à 37° C por 180 minutos no escuro. Como controle positivo, as amostras foram incubadas com 10µM de nitroprussiato de sódio (Dias et al., 2014)

4.11. Análise do ciclo celular

Através deste protocolo foi determinado o conteúdo de DNA das células por meio da coloração com iodeto de propídeo (PI) através da citometria de fluxo. O PI é um agente intercalante fluorescente de DNA que é capaz de penetrar na célula quando a membrana celular é permeabilizada, corando o DNA. Desta forma, a fluorescência emitida pelo PI é proporcional à quantidade de DNA das células. Inicialmente, 1×10^6 de células da medula óssea foram ressuspensas e fixadas em 1 mL de etanol 70% por pelo menos 2 horas a -20°C . As células foram lavadas, ressuspensas em 1 mL de PBS gelado e incubadas com 200 μL de solução de coloração (200 μL de RNase A (20 mg/mL), 800 μL de PI (500 $\mu\text{g/mL}$), 20 μL de Triton X-100, Q.s.p. 20 mL de PBS1x) por 30 minutos, no escuro, a 4°C . Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e, após acentrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 200 μL de PBS e a fluorescência emitida pelo PI medida no citômetro de fluxo. A taxa de aquisição foi de 200 células/segundos para que fosse possível diferenciar *singlets* e *doublets*. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* FACSDiva. Os histogramas da fluorescência emitida foram analisados para detectar a presença de DNA fragmentado (região sub- G_0/G_1), DNA normal (diploide – região G_0/G_1 , antes da síntese de DNA), DNA em processo de duplicação (região S) e DNA duplicado (poliploide – região G_2/M) (Figura 2).

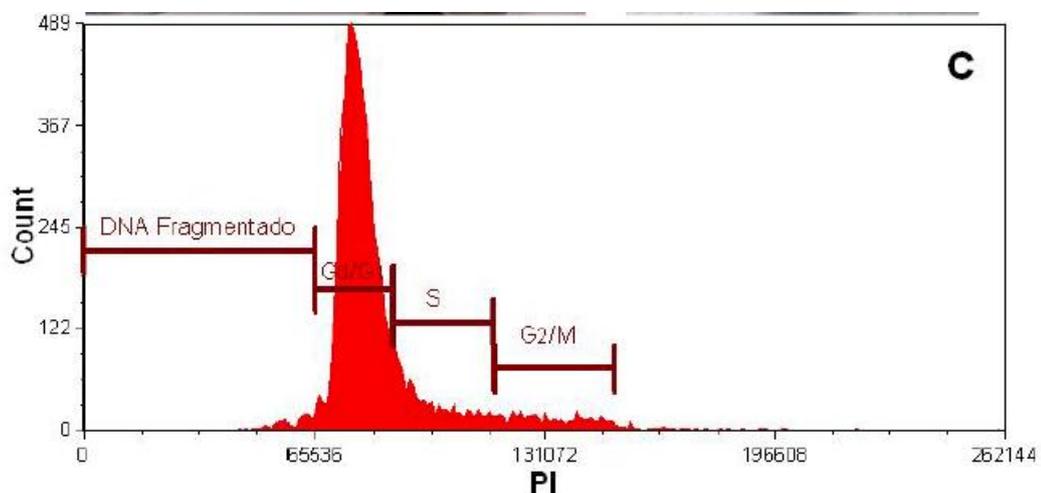


Figura 2: Histograma típico representativo do ciclo celular avaliado por citometria de fluxo com uso de PI.

4.12. Análise da Apoptose

Para determinação de viabilidade e apoptose celular foi utilizada a marcação com o reagente Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit® (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante intracitoplasmático iodeto de propídeo (PI: *Propidium Iodide*), seguida análise em citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose (van Engeland *et al.*, 1996). Portanto, neste ensaio é possível determinar a proporção de células vivas (anexina V⁻/PI⁻); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V (anexina V⁺/PI⁻); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI, fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V⁺/PI⁺), Figura 3.

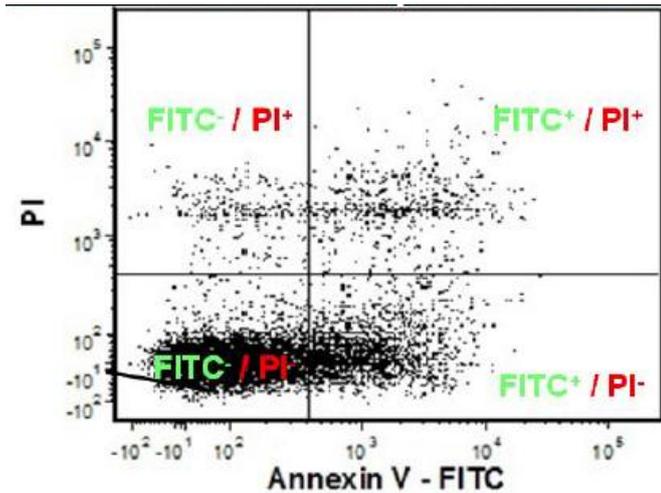


Figura 3: Citograma típico obtido durante a aquisição dos dados e análise dos resultados de apoptose

4.13. Análise Estatística

Para a análise estatística foi utilizado o teste de variância ANOVA uma via através do software GraphpadPrism 6 seguido pelo *pos hoc* de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Resultados

5. Resultados

5.1. Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca

Após os 28 dias de experimento, antes da eutanásia dos animais, os mesmos foram submetidos a aferição da pressão arterial e da frequência cardíaca. Os valores estão apresentados na tabela abaixo (TABELA 1), como podemos observar os animais submetidos a indução da hipertensão tiveram tanto sua pressão arterial média ($126\pm 3\text{mmHg}$) quanto sua frequência cardíaca ($520\pm 13\text{bpm}$) aumentada quando comparados ao grupo Sham (PAM: $105\pm 2\text{mmHg}$; FC: $453\pm 20\text{bpm}$). Os animais que foram submetidos ao tratamento com sildenafil conseguiram reduzir esses valores quando comparados ao grupo hipertenso sem tratamento (PAM: $110\pm 2\text{mmHg}$; FC: $470\pm 13\text{bpm}$).

Tabela 1: Pressão arterial média e frequência cardíaca.

Grupo	Pressão Arterial (mmHg)	Frequência Cardíaca (bpm)
Sham	105 ± 2	453 ± 20
2R1C	$126\pm 3^*$	$520\pm 15^*$
Sildenafil	$110\pm 2^\#$	$470\pm 13^\#$

Os valores indicam média \pm EPM. * $p < 0,05$ 2R1C vs. Sham. $^\#p < 0,05$ Sildenafil vs. 2R1C. N=4

5.2. Peso Corporal

Também após 28 dias, 14 dias de cirurgia mais 14 dias de tratamento com veículo ou sildenafil, os animais foram pesados e eutanasiados para posteriores análises. O gráfico 1 apresentando abaixo, mostra os valores de peso corporal dos três grupos analisados (n=10). Antes da indução da hipertensão, todos os grupos possuíam animais com peso entre 22,9g a 23,1g. Como podemos observar, após 28 dias, os animais considerados hipertensos (23,9g) apresentaram uma diminuição significativa do peso em relação ao grupo que não apresentava hipertensão (24,1g). Porém não houve diferença do grupo hipertenso tratado (24,3g) em relação ao grupo SHAM.

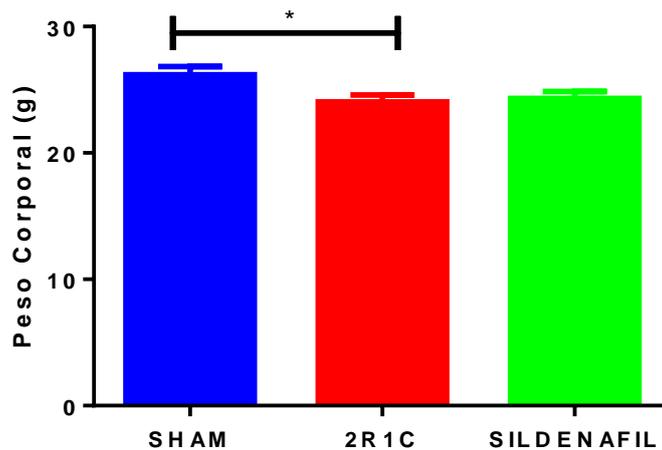


Figura4: Peso corporal após 28 dias de experimento. Os valores indicam a média±EPM. * $p < 0,05$ vs. Sham (ANOVA uma via, *post hoc*Tukey). N=12

5.3. Peso seco cardíaco e renal

Os gráficos abaixo mostram o peso seco do coração e rins direito e esquerdo, onde o coração e rins após 28 dias de experimento, foram isolados, lavados com solução fisiológica e mantidos na estufa a 37° C por 24 horas. O peso obtido (mg) foi corrigido pelo valor da tibia (cm), para verificar a existência de hipertrofia cardíaca e como podemos observar, não houve diferença significativa entre os grupos. Uma das características do modelo 2R1C, já descrito pela literatura, é a atrofia do rim clipado que se dá pela estenose da artéria renal esquerda, e isso foi confirmado através dos nossos animais, onde houve a presença de atrofia no grupo 2R1C (SHAM: 0,043; 2R1C: 0,026g), além disso podemos observar que no grupo tratado com sildenafil (0,061g) a atrofia do rim do esquerdo foi significativamente menor que o grupo hipertenso sem tratamento. Já no rim direito não observamos nenhuma alteração significativa.

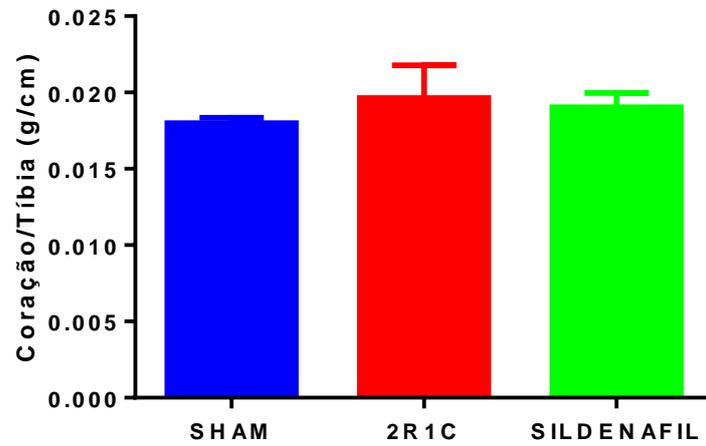
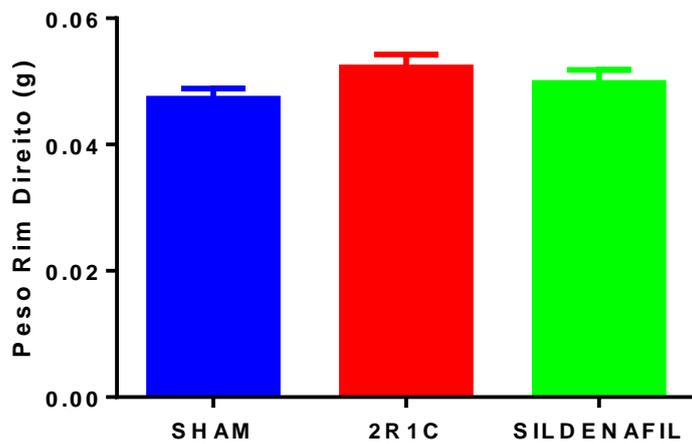
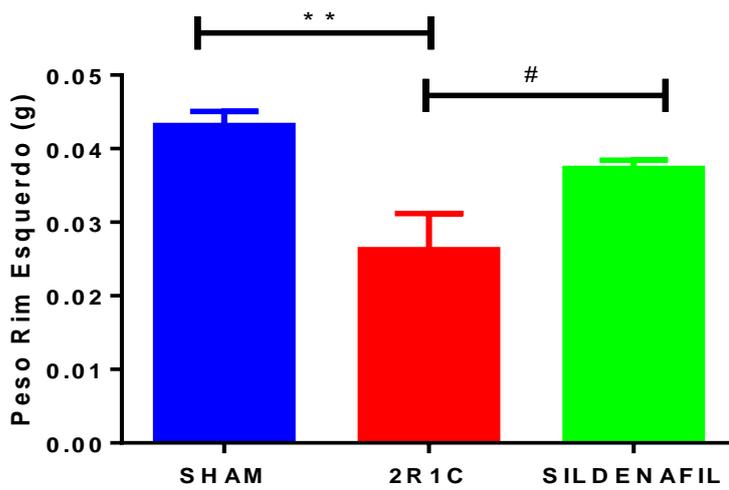


Figura 5: Peso seco do coração corrigido pelo valor da tíbia (mg/cm). Os valores indicam a média±EPM (ANOVA uma via, *post hoc*Tukey)



Figuras 6 e 7. Peso seco dos rins esquerdo e direito. Os valores indicam a média±EPM. **p< 0,05 2R1C vs.Sham, #p< 0,05 Sildenafilvs. 2R1C (ANOVA uma via, *post hoc*Tukey). N=11

5.4. Quantificação celular

Na tabela apresentada abaixo, a contagem celular realizada na câmara de Neubauer nos mostra que houve uma diminuição do número de células presentes na medula óssea de animais hipertensos, já nos animais hipertensos tratados com sildenafilobservamos um aumento no número de células, superando até o número de células presente em animais do grupo Sham.

Grupos	n	Células
Sham	7	4,5 x 10 ⁶ ± 1,1
2R1C	6	2,4 x 10 ⁶ ± 0,7 *
Sildenafil	5	6,3 x 10 ⁶ ± 1,7 #

Tabela 2: Contagem de células da medula óssea na câmara de Neubauer. Os valores indicam a média±EPM. *p< 0,05 2R1C vs.Sham.#p< 0,05 Sildenafilvs. 2R1C

5.5. Imunofenotipagem

Para confirmar a presença de células tronco hematopoiéticas (CTHs) nas amostras obtidas das medulas ósseas, foi realizada a imunofenotipagem através da citometria de fluxo. Os dados obtidos confirmaram a presença de CTHs e não houve diferença na intensidade de fluorescência entre os grupos. A linha preta não preenchida representa o controle de isotipo e a linha azul preenchida representa o anticorpo de marcação.

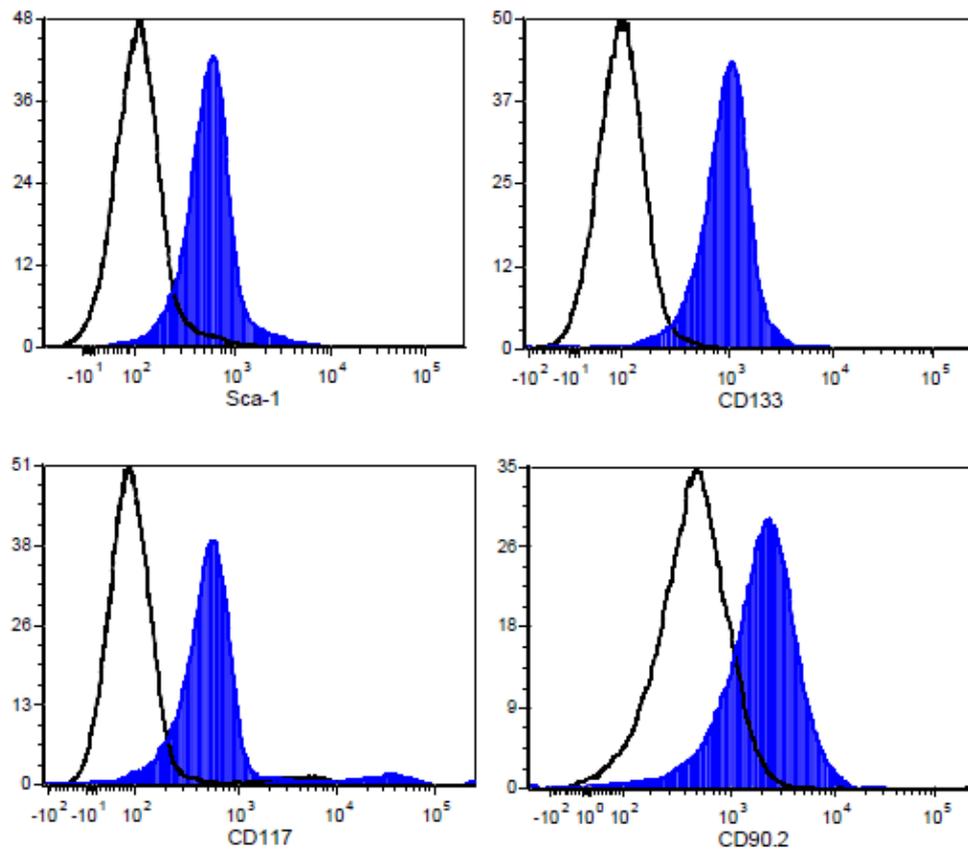


Figura 8: Imunofenotipagem de células-tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea

5.6. Análise do Estresse Oxidativo

5.6.1. Níveis de ROS

Os níveis de ânion superóxido foram quantificados pela marcação de DHE por meio de citometria de fluxo. Na Figura 9, podemos observar que houve um aumento na produção desses radicais em animais hipertensos (SHAM: 1351 ± 206 ; 2R1C: 1973 ± 337) e a diminuição nos animais hipertensos tratados com sildenafil (1483 ± 192).

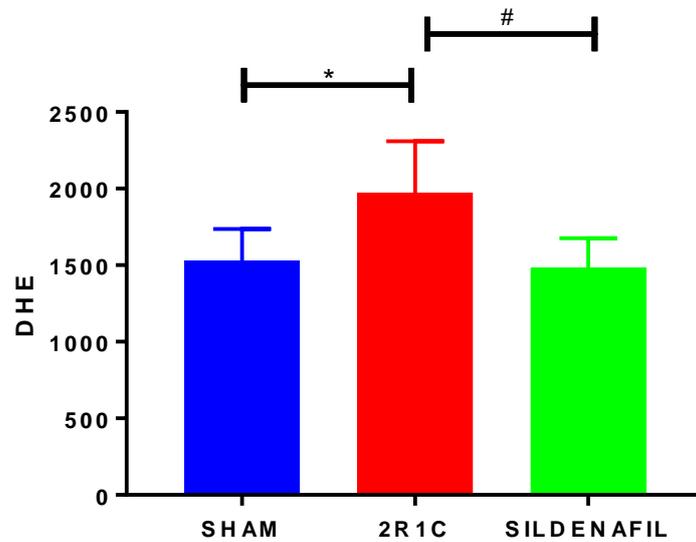


Figura 9: Níveis de ânion superóxido nas células troncohematopoiéticas. Os valores indicam a média±EPM. * $p < 0,05$ vs. Sham $p < 0,05$ 2R1C vs. Sildenafil. N =10

Com relação aos níveis de peróxido de hidrogênio, os mesmos foram quantificados através da intensidade da fluorescência marcada pelo DCF. Os valores obtidos em nosso estudo podem ser observados na Figura 10, onde os níveis de peróxido de hidrogênio estão aumentados no grupo hipertenso (SHAM: 3805 ± 237 ; 2R1C: 6562 ± 456) e significativamente diminuídos nos animais hipertensos tratados com sildenafil (4447 ± 395) em relação aos outros grupos.

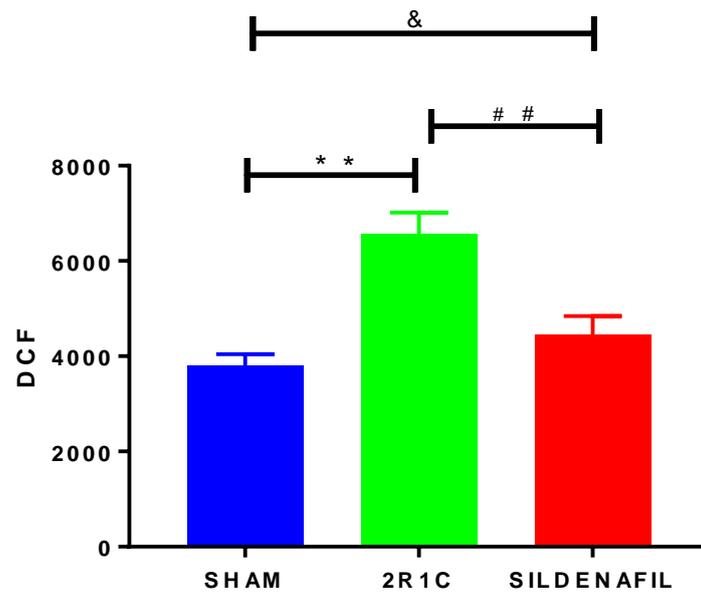


Figura 10: Níveis de peróxido de hidrogênio nas células tronco hematopoiéticas. Os valores indicam a média±EPM. ** $p < 0,01$ Sham vs. 2R1C, ## $p < 0,01$ 2R1C vs. Sildenafil, & $p < 0,05$ Sham vs. Sildenafil. N= 10

Para os níveis de espécies altamente reativas marcados pelo HPF também houve diferença estatística entre os grupos (SHAM: 1653±303; 2R1C: 2529±196; SILDENAFIL: 1611±252), conforme mostrado na Figura 11.

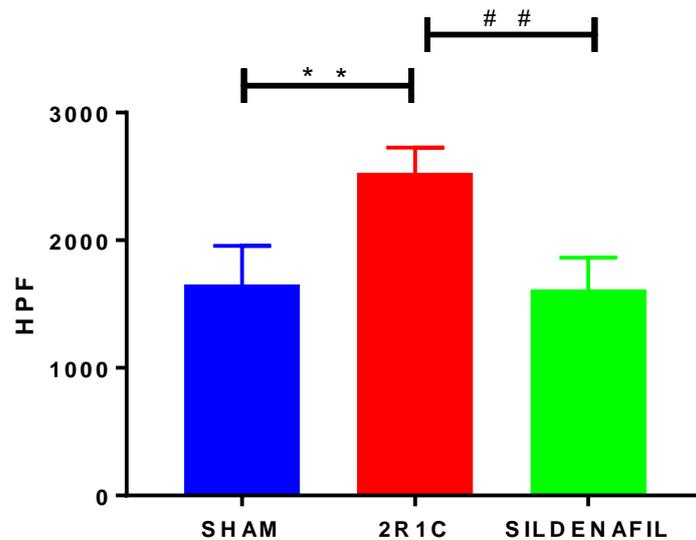


Figura 11: Níveis de espécies altamente reativas nas células-tronco hematopoiéticas. Os valores indicam média±EPM. ** $p < 0,01$ Sham vs. 2R1C, ## $p < 0,01$ 2R1C vs. Sildenafil. N=8

Com o marcador DAF, foi possível quantificar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Como podemos observar na Figura 12 houve um aumento significativo da biodisponibilidade de óxido nítrico no grupo sildenafil. (SHAM:3413±251; 2R1C:2897±763; SILDENAFIL: 3874±645).

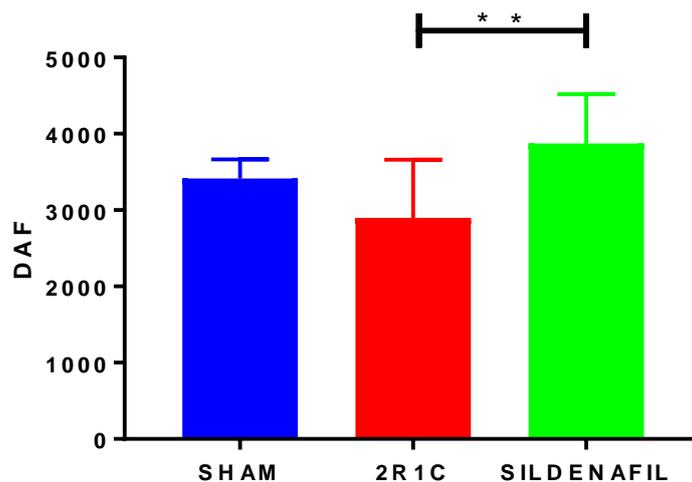


Figura 12: Níveis de NO nas células tronco hematopoiéticas. Os valores indicam a média±EPM ** $p < 0,01$ 2R1C vs. Sildenafil. N=8

5.6.2. Apoptose Celular

Na tabela 3 estão apresentados os dados de apoptose obtidos através da citometria de fluxo, podemos observar que houve diferença estatística entre os grupos. No grupo tratado com sildenafil a apoptose diminuiu significativamente quando comparada ao grupo hipertenso e grupo controle.

Grupos	n	Vivas (Q3)	Necrose (Q1)	Apoptose Inicial(Q4)	Apoptose Final (Q2)
Sham	7	59,3± 7,8%	0,40 ± 0,30%	38,8± 7,9%	1,40± 0,30%
2R1C	8	46,7± 6%*	0,36± 0,16%	51,4± 6,2%*	1,80± 0,40%
Sildenafil	8	80± 4,9% ^{##&}	0,20± 0,10% ^{&}	18,4± 4,8% ^{##&}	1,50± 0,50

Tabela 3: Apoptose das células tronco hematopoiéticas. Os valores indicam a média±EPM. *p< 0,05 e**p<0,01 Shamvs. 2R1C, #p<0,05 e##p<0,01 2R1C vs. Sildenafil, &p<0,05 e&&p<0,01 Shamvs. Sildenafil.

5.6.3. Ciclo Celular

Já na tabela 4 podemos observar os resultados da análise do ciclo celular. Não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Tabela 4: Ciclo celular das células tronco hematopoiéticas.

Grupos	n	Sub-G0	G0/G1	S/G2/M	G2/G1
Sham	9	1,81± 0,49%	88,09± 2,95%	11,91± 2,95%	1,95± 0,008%
2R1C	9	2,38± 0,76%	86,04± 3,69%	13,95± 3,69%	1,95± 0,005%
Sildenafil	9	1,60± 0,52%	88,49± 1,98%	11,50± 1,98%	1,95± 0,008%

Os valores indicam a média±EPM.

Discussão

6. Discussão

De acordo com Andrade e cols. (2015), a hipertensão arterial (HA) é uma das importantes responsáveis pela causa de óbito e um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Essas doenças vasculares foram as causas de óbitos mais importantes do mundo no período de 2000 a 2012, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, apesar da redução da mortalidade por essas doenças nos anos de 1996 a 2007, esse grupo ainda representou a principal causa de óbito no país em 2011. Para o ano de 2013, a prevalência de HAS referida na população de adultos residentes nas capitais brasileiras e no Distrito Federal foi de 24,1%. No Espírito Santo a prevalência foi de 20,6%.

Grande parte dos hipertensos desconhece sua condição e, dos que a conhecem, apenas 30% apresentam um controle adequado (Olmos e Lotufo, 2002). E se não tratada, a hipertensão causa dano ao endotélio vascular, resultando em uma resposta proliferativa, aterosclerose e podendo também aumentar os riscos de acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência renal crônica (NAVAR et al, 1998).

A hipertensão renovascular é a forma mais comum de hipertensão secundária e apresenta patogênese complexa, na década de 30, Goldblatt e colaboradores (1934) desenvolveram o modelo de hipertensão renovascular 2R1C em cães. Posteriormente, em 1970 foi estabelecido este em modelo em rato. E em 1997 Wiesel e colaboradores, desenvolveram em camundongos e verificaram que os modelos murinos possuem as mesmas características dos modelos desenvolvidos em outras espécies de animais, como cães e ratos (CAMPAGNARO, 2012).

O clipe utilizado neste modelo não é severo o suficiente para causar isquemia, no entanto, a redução da pressão de perfusão renal estimula o aumento da síntese de renina liberada do rim clipado (NAVAR et al, 1998). Na fase crônica deste modelo, a hipertensão é mantida pela ativação contínua do sistema renina-angiotensina enquanto o rim contralateral normal impede a hipervolemia (SANTOS et al, 2005).

No presente estudo, foi observada a redução do peso corporal em animais submetidos à colocação do clipe e isso corrobora com resultados já mostrados em nosso laboratório (DIAS et al, 2014; CAMPAGNARO et al, 2013; NOGUEIRA et al 2012). Já os animais hipertensos tratados com Sildenafil não apresentaram alteração no peso corporal. Na análise da razão do peso do coração pelo comprimento da tibia não foi encontrada diferença entre os grupos, isso também já foi observado em outro trabalho do nosso laboratório (DIAS et al, 2014).

Uma das características marcantes deste modelo são as mudanças estruturais renais devido à estenose da artéria esquerda causando a atrofia do rim esquerdo, o que pode ser observado em nosso estudo. Assim, o achado mais importante foi que o tratamento com sildenafil diminuiu essa atrofia do rim esquerdo. Especulamos de que este benefício do sildenafil seja consequência na melhora dos níveis hiperpressóricos e também melhora da função cardíaca. Estudos mostram que o sildenafil atua como vasodilatador onde produz um balanço entre a diminuição da resistência arterial e o aumento da complacência venosa (JACKSON et al, 1999), Brindis e Kloner (2003) mostra que em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva há alterações benéficas na hemodinâmica com o uso de sildenafil, além disso o sildenafil tem sido objeto de estudo em diversas pesquisas sobre doenças cardiovasculares (KUKREJA et al, 2011; DONATO et al, 2013)

A medula óssea hematopoiética, que dá origem a todas as células sanguíneas em circulação, é altamente organizada e complexa. Células sanguíneas maturadas são derivadas de células-tronco hematopoiéticas que compõe uma complexa série de passos de divisão e maturação. Os fatores que regulam esta proliferação ainda não foram completamente elucidados, no entanto, é bem conhecido que a hematopoiese é controlada por um combinado de efeitos causado pelo aumento de citocinas, fatores de crescimento, receptores de superfície celular específico e sinais microambientais locais da medula óssea. Por ser uma área de crescimento celular excessivo, a presença de SRA local pode ser sugerido (HAZNEDAROGLU e OZTURK, 2003).

Um efeito importante observado na hipertensão é o estresse oxidativo. A colocação do clipe em uma das artérias renais ativa o SRA induzindo ao desequilíbrio entre a

produção aumentada de radicais livres e a diminuição do sistema antioxidante, levando a hipertensão e disfunção endotelial. Estes dados puderam ser comprovados em nosso estudo, pois observamos uma grande produção de radicais livres. Outros estudos também mostram esse aumento na produção de ROS em grupos hipertensivos (DIAS, 2014; CAMPAGNARO, 2012; PARAVICINI e TOUYZ, 2006). Pacientes com hipertensão demonstram níveis elevados de estresse oxidativo juntamente com a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes endógenas no sangue e células mononucleares, esses pacientes também possuem indicações do aumento de dano oxidativo ao DNA quando comparados a indivíduos normotensos (PARAVICINI e TOUYZ, 2006). Podemos também observar uma diminuição do estresse oxidativo no grupo tratado com sildenafil em relação aos outros grupos. Essa diminuição de produção de ROS promovido pelo sildenafil, que é um grande antioxidante, já é bem conhecido na literatura (BERNARDES, 2015; DIAS, 2014)

Radicais livres como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio induzidos pelo estresse oxidativo são conhecidos por gerarem danos celulares em várias doenças e alguns estudos demonstraram que o estresse oxidativo no ciclo celular revela o aumento de dano ao DNA induzido por ROS e está correlacionado com a parada do ciclo celular. Samikannu e colaboradores em 2015 demonstraram que o aumento do estresse oxidativo conduz a uma disfunção do ciclo celular levando a neurodegeneração em pacientes com HIV. Tiwari e colaboradores em 2013 mostraram que exposição a hiperóxia também conduz ao aumento da produção de ROS, inibindo a proliferação, parada do ciclo celular e eventualmente a morte celular. Em resposta ao dano ao DNA, células viáveis param em fases discretas do ciclo celular tanto para permitir a reparação do DNA que é essencial para a sobrevivência da célula quanto para a morte celular quando o dano é muito grande (RAY et AL, 2013).

As ROS são importantes para a determinação do destino das células-tronco normais. Células-tronco hematopoiéticas normais estão, principalmente, em estado quiescente dentro do seu nicho na medula óssea. Naka e colaboradores mostram que diversos estudos com animais knockout para genes envolvidos no estresse oxidativo como ATM e FOXO não permitem que as CTHs fiquem em seu estado

quiescente ou até mesmo se auto renovar. CTHs expostas a ROS apresentam características alteradas elevadas e podem se submeter tanto a proliferação quanto a diferenciação, mas também podem ser levadas a senescência e a apoptose (RICHARDSON et al., 2015).

Chen e colaboradores (2016) dizem que os nichos da CTHs na medula óssea são localizados no extremo do gradiente de oxigênio sugerindo que a redução de oxigênio poderia ser benéfica para a função das CTHs.

Isso pode ser observado em nosso estudo, onde o número de células em apoptose aumentou drasticamente em animais hipertensos, como consequência o número de células presentes na medula óssea caiu significativamente. Mas esta situação foi revertida com o tratamento com sildenafil.

Um dos dados interessantes deste estudo foi que em animais hipertensos ocorreu a diminuição drástica de células presentes na medula óssea. Essa diminuição também foi observada em outro estudo e de acordo com Campagnaro (2008), uma das prováveis explicações para esta diminuição é a atividade pró-inflamatória da angiotensina II que leva ao aumento exacerbado da taxa de divisão assimétrica de células tronco.

Veneri e colaboradores (2015), diz que estudos clínicos e experimentais sugerem que a contínua inibição de PDE5, fazendo com que os níveis de cAMP e cGMP estejam aumentados, seja associado com cardioproteção e neuroproteção. Em pacientes com diabetes tipo 2, o tratamento com sildenafil está associado com cardioproteção e redução de níveis de citocinas inflamatórias, além disso, alguns destes estudos relataram a melhora nos perfis de citocinas circulantes e redução do estresse oxidativo.

Um estudo recente (SAXENA et AL, 2016) mostra que a indução de cAMP melhora a geração de células-tronco hematopoiética, o que indica que a cascata do cAMP esteja envolvida no desenvolvimento hematopoiético. Isso pode explicar a melhora dos animais tratados com sildenafil em todos os aspectos analisados em nosso estudo, principalmente no número de células presentes na medula óssea. Porém, não há na literatura estudos que mostrem a relação do sildenafil com o

microambiente da medula óssea, assim, nosso estudo se torna um dos pioneiros em mostrar os benefícios do sildenafil em células-tronco hematopoiéticas.

Conclusão

7. Conclusão

Podemos concluir com o presente estudo, sendo este um dos pioneiros amostrar o tratamento com o inibidor de PDE5 (SILDENAFIL) na hipertensão renovascular de camundongos e seus efeitos na células-tronco hematopoiéticas, que: 1) Na hipertensão renovascular a produção de ROS está aumentada; 2) O número de células presentes na medula óssea cai drasticamente com a hipertensão renovascular; 3) Grande parte das CTHs sofrem apoptose quando há a presença da hipertensão renovascular; 4) E o tratamento com sildenafil melhora todos os elementos analisados neste estudo, tendo até uma melhora comparado ao grupo controle.

Então com os achados deste estudo, concluímos que o tratamento com o Sildenafil pode ser considerado uma escolha benéfica e alternativa para o tratamento de células-tronco hematopoiéticas prejudicadas pela hipertensão arterial renovascular, visto que estas células são de grande importância para a homeostase do organismo e também que estas células são a primeira escolha para o tratamento com terapia celular. Porém, o mecanismo de ação pelo qual o sildenafil melhora vários parâmetros destas células ainda deve ser elucidado.

Referências Bibliográficas

8. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. Fisiologia, 4ª ed., Ed. Guanabara Koogan/GEN, Rio de Janeiro, 2012
- ANDRADE, SSA et al. Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 24(2): 297-304, abr-jun, 2015.
- AMAT N et al. Aqueous extract of dioscorea opposite thumb normalizes the hypertension in 2K1C hypertensive rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, 2014.
- ARAUJO, M and WILCOX, CS. Oxidative Stress in hypertension: Role of the kidney. **Antioxidants & Redox Signaling**. V 20, 2014
- BERNARDES FP. Avaliação dos efeitos do tratamento com Sildenafil sobre células de medula óssea de camundongos hipercolesterolêmicos. Dissertação de Mestrado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2015.
- BRINDIS, RG, KLONER, RA. Sildenafil in patients with cardiovascular disease. **Am J Cardiol**, v 6, 2003
- CAMPAGNARO BP. Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células tronco da medula óssea de camundongos. Dissertação de Mestrado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2008.
- CAMPAGNARO B.P et al. Renovascular hypertension leads to DNA damage and apoptosis in bone marrow cells. **DNA Cell Biol**, v. 32, n.8, p. 458-466, 2013.
- CAMPAGNARO BP. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células hematopoiéticas e endoteliais de camundongos. Tese de Doutorado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2012.

CHEN, J et al. Long-term adaption to hypoxia preserves hematopoietic stem cell function. **Experimental Hematology**.2016

DIAS AT.Efeitos do tratamento com sildenafil na hipertensão experimental renovascular. Dissertação de mestrado. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2014.

DONATO, M. A. et al. Além da Disfunção Erétil. Cadernos de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde. Facipe. v. 1, n2, p 11-22. 2013.

DUSSAULT S. et al. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E deficient mice. **Hypertension**, v. 54, p. 1043-1049, 2009.

EBRAHIMI F, et al. Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in diabetic mice: reduction of oxidative stress as a possible mechanism. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 87, p. 556-564, 2009.

FAZAN JR, R et al. Modelos de hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 19-29, 2001.

GOLDBLATT H, LYNCH J, HANZEL RF, ET AL. Studies on experimental hypertension -II: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med**, 59:347-379, 1934.

HAZNEDAROGLU, CI e OZTURK, MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow renin-angiotensin system. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**.35: 867-880, 2003.

JACKSON, G. et al. Effects of Sildenafil Citrate on human hemodynamics. **The American Journal of Cardiology**. v. 83, p. 13-20, 1999.

JONES, DP. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res*, v. 9, p. 169-181, 2006.

KHANGURA KK et al. Cardiac function in renovascular hypertensive patients with and without renal dysfunction. ***Am J Hypertens***, v. 27, p 445-453, 2014.

KUKREJA, R. C. et al. Emerging new uses of phosphodiesterase-5 inhibitors in cardiovascular diseases. ***Experimental & Clinical Cardiology***. v. 16, n. 4. p. 1- 6, 2011.

LANE A.A., SCADDEN DT. Stem Cells and DNA Damage: Persist or Perish? ***Cell***, v.142, p. 360-362, 2010.

MILYAVSKY M. et al. A Distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. ***Cell Stem Cell***, v.7, p. 186-197, 2010.

MANDAL PK., ROSSI DJ. DNA- damage-induced differentiation in hematopoietic stem cells. ***Cell***, v. 148, p.847-848, 2012.

NAKA K., OHMURA M., HIRAO A. Regulation of the self-renewal ability of tissue stem cells by tumor-related genes. ***Cancer Biomark***, v 3, p 193-201. 2007

NAVAR LG et al. Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension. ***News Physiol Sci***. v 13, p 170–176.1998

NOGUEIRA BV et al. Granulocyte colony stimulating factor prevents kidney infarction and attenuates renovascular hypertension. ***Cell Physiol Biochem***, v 29, p 143-152. 2012

OLIVEIRA-SALES EB. Respostas cardiovasculares à administração de Vitamina C no modelo de hipertensão arterial renovascular experimental. Dissertação de mestrado. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Fisiologia, 2006.

OLMOS, RD e LOTUFO, PA. Epidemiologia da hipertensão arterial no Brasil e no Mundo. **Rev Bras Hipertens.** 9: 21-23,2002.

PARAVICINI, TM e TOUYZ, RM.Redox signaling in hypertension.**Cardiovascular Research.** 71: 247-258, 2006

PIETENPOL JA, STEWART ZA. Cell Cycle checkpoint signaling: cell cycle versus apoptosis. **Toxicology**, p. 181-182, 2002

RAY A et al. NER initiation factors, DDB2 and XPC, regulate UV radiation response by recruiting ATR and ATM kinases to DNA damage sites. **DNA repair**, v 12, p 273-283. 2013

RICHARDSON, C., YAN, S e VESTAL, CG.Oxidative Stress, Bone Marrow Failure, and Genome Instability in Hematopoietic Stem Cells.**Int J Mol Sci.** 2366-2385.2015

RODRIGUES, BP. Efeito do sildenafil na genotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em camundongos ateroscleróticos. Dissertação de mestrado. Vitória:Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, 2013.

RODRIGUES, BP et al. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. **Lipids Health Dis.** 12:128, 2013

SAMIKKANNU T, et al. HIV-1 gp120 and morphine induced oxidative stress: role in cell cycle regulation. **Front. Microbiol.**6 p 614, 2015

SANTOS, CM et al. Water intake during the development of renal hypertension (2K-1C) in mice.**Physiology & Behavior.** 85: 512-515. 2005

SAXENA, S et al. Cyclic AMP Signaling through epac axis modulates human hemogenic endothelium and enhances hematopoietic cell generation. **Stem Cells Report.**692-706. 2016.

SHARIKABAD MN, OSTBYE KM, LYBERGT, et al. Effect of extracellular Mg²⁺ on ROS and Ca²⁺ accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**; v. 280(1), p. H344-H353, 2001

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, v. 95, p. 1-51, 2010.

SCHAFER KA. The Cell Cycle: A Review. **Vet Pathol**, p. 35-36, 1998.

SOUZA FC. Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16 replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q. Dissertação de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2011.

TIWARI, A. *et al.* Ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood on acellular scaffolds prepared from MS-5 stromal cell line. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, p 871-883, 2013.

VAN ENGELAND M et al. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. **Cytometry**. v 24, p 131-139, 1996.

VENNERI, MA et al. Chronic inhibition of PDE5 limits pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization in streptozotocin-induced diabetic mice. **Plos One**. 2015

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, et al. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. **Hypertension** v 4, p 1025-1030, 1997.