

**Avaliação dos efeitos do tratamento com
sildenafil na hipertensão induzida por infusão de
angiotensina II**

Ananda Tissianel Dias

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas

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

Vitória
2018

Ananda Tissianel Dias

**Avaliação dos efeitos do tratamento com
sildenafil na hipertensão induzida por infusão de
angiotensina II**

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

Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez

Vitória
2018

Ananda Tissianel Dias

Avaliação dos efeitos do tratamento com sildenafil na hipertensão induzida por infusão de angiotensina II

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

Aprovada em 13 de Novembro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez – Orientador

Profa. Dra. Alessandra Simão Padilha – UFES

Profa. Dra. Sônia Alves Gôuvea – UFES

Prof. Dr. Jairo Pinto de Oliveira - UFES- Alegre

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade – Universidade Vila Velha

DEDICATÓRIA

À minha mãe e filha, que junto
comigo viveram intensamente
este projeto (sonho).

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço a bondade, tenho certeza de que esses projetos (vida pessoal e profissional) são planos Dele para mim e com todo seu amor todas as coisas foram acontecendo da melhor maneira que poderiam acontecer. Te louvo por tudo, Senhor.

Ao professor Dr. Elisardo Corral Vasquez minha eterna gratidão por tudo que vivi e aprendi ao longo destes 6 anos na Pós-Graduação e ainda preciso agradecer pelos sonhos que existem em mim, pois és o responsável por muito deles. A sua excelência e dedicação são admiráveis e incontestáveis, muito obrigada por ter maestria em nos ensinar, saiba que agradeço a Deus pela sua vida.

Aos meus pais pelo zelo e pelo amor dedicado a mim, mas especialmente a minha mãe, que sonhou, que sofreu e que vibrou cada dia. Mãe, você foi a melhor mãe e a melhor avó que poderia ter sido, muito obrigada por cuidar tão bem da Yasmin, com certeza sem a sua ajuda a jornada teria sido muito mais difícil, muito obrigada por todo amor dedicado a nós.

A minha princesa Yasmin, você não teve escolha, filha, quando mamãe te recebeu, já estava neste projeto e precisava executá-lo. Filha, te dei todos os colos que podia e os que não podia também, ainda assim, alguns tiveram que ser adiados, mas tudo isso foi para o nosso bem e tenho certeza de que, quando puder entender tudo que se passou, terá orgulho da mamãe. Te amo. (Pra Yasmin ler)

Ao Silas, meu esposo, agradeço o apoio e o incentivo. Seu auxílio em todos os momentos foi essencial ao longo de todos esses anos.

Ao meu irmão Bruno, à cunhada Camyla e ao meu príncipe Murillo agradeço o amor e o carinho.

Aos meus familiares agradeço as orações e por vibrar com cada conquista.

À professora Dra. Silvana dos Santos Meyrelles agradeço as orientações e a parceria no Laboratório de Fisiologia Translacional, foram tempos de muito aprendizado. Foi muito bom poder dividir a minha rotina com você (foram meses e meses de horário almoço compartilhado). Foi um prazer ter a oportunidade de conviver mais de perto com você.

À professora Dra. Ágata Lages Gava agradeço todo apoio, todo incentivo e toda orientação no Laboratório de Fisiologia Translacional.

À professora Dra. Bianca Prandi Campagnaro agradeço as orientações, as discussões e o incentivo. É um enorme prazer ficar ao seu lado, poder compartilhar a

vida com você é sempre muito bom. Vou lembrar para sempre esse seu jeito “leve e doce” de levar vida.

À professora Dra. Marcella Leite Porto agradeço a amizade e a parceria. Obrigada pelos experimentos realizados com o citômetro de fluxo, mesmo estando grávida da princesa Maya.

Ao professor Dr. Thiago de Melo, que foi o responsável por plantar a semente e, com isso, surgiram novos sonhos, Agradeço. É admirável como conduz todo trabalho, esteve presente em todos momentos, desde a idealização do projeto até aqui. Minha eterna gratidão.

Ao professor Dr. Manuel Campos-Toimil, por se interessar pelo projeto e por trabalhar para publicação do artigo.

Ao professor Dr. Breno Nogueira, por abrir as portas do seu laboratório e por possibilitar a realização da análise morfológica no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins e pela disponibilidade em nos atender.

Ao Marcos André Soares Leal (Marquinhos) minha eterna gratidão por ter abraçado este projeto, por ter aceito fazer os experimentos da reatividade da aorta (em meio aos dias atribulados de viagem para o Canadá) e por sempre estar disposto a ajudar em tudo que fosse necessário em relação ao projeto e ao Laboratório de Fisiologia Translacional, além de ser um grande amigo.

Ao Tadeu Zanardo, do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, agradeço a dedicação ao realizar a histologia.

À Gisele Alves, agradeço a doação do Viagra® e a colaboração nos dias de experimento, além da amizade.

À Bianca Rodrigues agradeço a amizade, o carinho e todos os cafés. Como eu, também trouxe ao mundo um príncipe chamado Luís Felipe durante a jornada do doutorado.

À Andreia Friques agradeço a amizade, a companhia agradável, o bom ânimo; sua energia e sua alegria torna a rotina mais leve.

Aos amigos que fiz na Universidade Federal do Espírito Santo e que participaram da minha vida ao longo da caminhada, vocês foram muito importantes, Glênia Sarnágli, Jairo Oliveira, Rafaela Aires, Eduardo Frizzera, Maria Eduarda, Camille Balarini, Frederico Felipe, Flávia Freitas, Simone Alves, Nathalie Lima e Fabricio Bragança obrigada pelas conversas pelos corredores e pelos cafés.

À todos os alunos do laboratório de Fisiologia Translacional, Caroline Thomes, Thamyris Pandolfi, Arthur Roberto, Nayara Damacena, Rossana Maimoni.

À CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq e a FAPES pelo apoio financeiro para execução deste projeto.

A melhor maneira de nos prepararmos para o futuro é concentrar toda imaginação e entusiasmo na execução perfeita do trabalho de hoje.

Dale Carnegie

RESUMO

A angiotensina II (Ang II) é responsável por múltiplas ações no organismo, sendo considerada o peptídeo efetor de uma variedade de ações fisiológicas e fisiopatológicas induzidas pelo sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), tendo importante papel no desenvolvimento da hipertensão arterial (HA), sendo capaz de promover efeitos deletérios em órgãos alvo da HA, como alterações morfofuncionais em artérias de condutância e de resistência e no coração. O objetivo do presente estudo foi verificar a hipótese de que o inibidor da Fosfodiesterase 5 (PDE5), sildenafil, possa contribuir para redução dos danos causados por aumento da Ang II, para isso verificamos o efeito do tratamento sobre a pressão arterial (PA), a hipertrofia cardíaca, os níveis plasmáticos de Ang II, as alterações morfofuncionais das artérias de condutância e de resistência, e a influência sobre o estresse oxidativo sistêmico e em células vasculares. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos divididos nos seguintes grupos: animais normotensos (Controle), animais hipertensos por infusão de Ang II (1000 ng/kg/min, durante 4 semanas) tratados com sildenafil (40 mg/kg/dia) ou com veículo (água), durante as duas últimas semanas. A análise temporal da PA sistólica (PAS) foi realizada durante todo o período experimental (antes da infusão e 7, 14, 21 e 28 dias após a infusão de Ang II). Ao final do tratamento os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado para dosagem da Ang II no plasma e o coração foi removido para verificação da hipertrofia cardíaca. O leito vascular mesentérico (LVM) e a aorta torácica foram removidos para as análises de função vascular, da morfologia e do estresse oxidativo. Após 4 semanas, os animais hipertensos apresentaram aumento da PAS (186 ± 3 mmHg), de Ang II plasmática ($53 \pm 2,4$ pg/mL) e no índice de hipertrofia cardíaca ($0,09 \pm 0,003$ mg/mm) e o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir em 23 mmHg a PAS, em 30% os níveis plasmáticos de Ang II e em 32% a hipertrofia cardíaca. Na análise da função vascular, observamos aumento da resposta contrátil nos animais hipertensos ($R_{m\acute{a}x}$: 70%) em ambos os vasos do estudo, apresentando hiper-reatividade a Norepinefrina no LVM e a Fenilefrina em anéis de aorta. O tratamento com sildenafil foi capaz de restaurar a função endotelial, reduzindo a hiper-reatividade às drogas adrenérgicas, e parte desses efeitos são, principalmente, por aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) e pela diminuição das espécies reativas de oxigênio (ROS) e dos prostanoídes vasoconstritores. Além das alterações funcionais a Ang II foi capaz de promover

aumento da área de secção transversa, induzindo a hipertrofia vascular e alteração na superfície endotelial, nossos dados demonstraram que o sildenafil foi capaz de promover alterações morfológicas importante, como redução da área de secção transversa e uma reestruturação das células endoteliais. Ao analisar a produção de ânion superóxido, peroxinitrito e radical hidroxila, observamos que a Ang II promove um aumento dessas ROS e o tratamento com sildenafil foi capaz reduzir a produção, contribuindo para redução do estresse oxidativo. Diante dos nossos resultados, verificamos que o sildenafil diminuiu os efeitos deletérios da Ang II sobre as alterações morfofuncionais de vasos de resistência e de condutância, principalmente por promover um equilíbrio entre ROS/NO/prostanoídes vasoconstritores e vasodilatadores. Sendo assim, nosso estudo poderá ser útil para novos estudos clínicos que buscam tratamentos para doenças cardiovasculares associadas a uma maior à ativação do sistema renina angiotensina e principalmente para tratamento dos pacientes com hipertensão resistente.

Palavras-chave: Hipertensão, angiotensina II, disfunção endotelial, sildenafil e estresse oxidativo.

ABSTRACT

Angiotensin II (Ang II) is responsible for multiple actions in the organism, being considered an effector peptide of several of physiological and physiopathological actions in the Renin-Angiotensin-Aldosterone (RAA) system. This endogenous peptide shows an important role in development of arterial hypertension (AH), since it is capable to promote deleterious effects target organs of AH, such as morphofunctional changes in arteries and heart. This study aimed to test the hypothesis that an inhibitor of phosphodiesterase 5 (PDE5), sildenafil, can reducing the damage caused by the increase of Ang II. Therefore, we evaluated the effects of the treatment on blood pressure (BP), cardiac hypertrophy, Ang II plasma levels, morphofunctional changes of the arteries of conductance and resistance, and the systemic and vascular cells oxidative stress. Male mice wild-type C57BL/6 were divided into the following groups: Normotensive (control) and hypertensive animals. Mice were induced to hypertension by Ang II infusion (1000 ng/kg/min, for 4 Weeks). Thereafter, we treated the groups with Sildenafil (40 mg/kg/day) or water for the last two weeks. Temporal analysis of systolic BP (SBP) was performed throughout the experimental period (prior to infusion and 7, 14, 21 and 28 days after the infusion of Ang II). At the end of the treatment the animals were anesthetized and the blood was collected for the plasma quantification of Ang II and the heart was removed to verify the cardiac hypertrophy. Mesenteric arterial bed (MAB) and thoracic aorta were removed for analyses of vascular function, morphology and oxidative stress. We found that, after 4 weeks, the hypertensive animals showed an increase of SBP (186 ± 3 mmHg), of plasma levels of Ang II (53 ± 2.4 pg/mL) and the index of cardiac hypertrophy (0.09 ± 0.003 mg/mm). The treatment with sildenafil was able to reduce the SBP in 23 mmHg and the Ang II plasma levels and cardiac hypertrophy showed a decreasing of 30% and 32%, respectively. Vascular function analyses revealed an increased contractile response in hypertensive animals (R_{max} : 70%) in both vessels of the study, presenting reactivity norepinephrine in MAB and phenylephrine in aortic rings. The treatment with sildenafil was capable to restore the endothelial function, reducing the reactivity to sympathomimetics drugs. Part of these effects are mainly caused by the increasing the nitric oxide (NO) and the decreasing of reactive oxygen species (ROS) and prostanoids vasoconstrictors. In addition to the morphofunctional changes, Ang II induced the vascular hypertrophy and promoted alteration in the endothelial surface. Treatment with sildenafil promoted

important morphological changes, such as reduction of the cross-sectional area and a restructuring of the endothelial cells. Superoxide anion, peroxynitrite and hydroxyl radical analyses revealed that Ang II increase in these ROS and the treatment with sildenafil was able to reduce oxidative stress. Taken together, our results demonstrate that sildenafil decreased the deleterious effects of Ang II on the resistance and conductance vessels, mainly by promoting a balance between ROS/NO/Prostanoids vasoconstrictors and vasodilators. This study represents an advance in the beneficial effects of sildenafil. The data present herein may be useful for new clinical studies for cardiovascular diseases treatment associated with intense activation of RAA system and for the hypertension resistant treatment.

Key Words: hypertension, angiotensin II, endothelial dysfunction, sildenafil, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico demonstrando a tendência de mortes	20
Figura 2. Sistemas envolvidos na regulação da pressão arterial	23
Figura 3. O sistema renina angiotensina clássico e sistêmico	26
Figura 4. As duas principais fontes de ROS na parede vascular	28
Figura 5: Esquema da via NO/GMPc e a inibição da fosfodiesterase 5 pelo sildenafil	32
Figura 6. Representação da minibomba osmótica ALZET	39
Figura 7. Avaliação da pressão arterial sistólica e da hipertrofia cardíaca	52
Figura 8. Avaliação dos níveis de Ang II no plasma	53
Figura 9. Avaliação da vasoconstrição em vasos de resistência e de condutância	54
Figura 10. Participação das espécies reativas de oxigênio na contração vascular	56
Figura 11. Avaliação da participação do óxido nítrico na contração vascular	59
Figura 12. Participação dos prostanoídeos derivados da COX-1 na contração vascular	62
Figura 13. Participação do Tromboxano A2 na contração vascular de anéis de aorta	64
Figura 14. Avaliação da produção ROS ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{ONOO}^-$ / $\bullet\text{OH}^-$ e H_2O_2)	66
Figura 15. Avaliação dos produtos de oxidação avançada de proteínas plasmática	67
Figura 16. Avaliação da secção transversa da parede vascular	68
Figura 17: Fotos típicas da superfície endotelial de artérias mesentéricas	69
Figura 18. Fotos típicas da superfície endotelial de aorta	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise do peso corporal, ingestão de água e volume urinário de 24 horas.....	50
Tabela 2. Valores de resposta máxima, sensibilidade e área abaixo da curva do LVM e da aorta em curvas de contração na ausência e presença de bloqueio com apocinina.....	57
Tabela 3. Valores de resposta máxima e sensibilidade e área abaixo da curva do LVM e da aorta em curvas de contração na ausência e presença de bloqueio com L-NAME.....	60
Tabela 4. Valores de resposta máxima e sensibilidade e área abaixo da curva do LVM e da aorta em curvas de contração na ausência e presença de bloqueio com SC-560	63
Tabela 5. Valores de resposta máxima e sensibilidade e área abaixo da curva da aorta em curvas de contração na ausência e presença de bloqueio com SQ 29548.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico
AMPc: Adenosina monofosfato cíclica
Ang: Angiotensina
Ang II: Angiotensina II
ANOVA: Análise de variância
AOPP: Produtos da oxidação avançada de proteínas
AT1: Receptor de Angiotensina II tipo 1
AT2: Receptor de Angiotensina II tipo 2
AVC: Acidente vascular cerebral
BH4: Tetraidrobiopterina
CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
CML: Célula muscular lisa
COX 1-2: Ciclooxygenase tipo 1 e tipo 2
C57BL/6: Linhagem de camundongo C57 black/6
 Δ AUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva
DCF: Diacetato de diclorofluoresceína
DCVs: Doenças cardiovasculares
DHE: Dihidroetídeo
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra acético
ECA: Enzima conversora de angiotensina
EMESCAM: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
EPM: Erro padrão da média
FACS: Separador celular ativado por fluorescência
FAD: flavina adenina
NF- κ B: fator de transcrição nuclear kappa B
FC: Frequência cardíaca
FE: Fenilefrina
FMN: Flavina mononucleotídeo
GCs: Guanilato ciclase solúvel
GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina
HA: Hipertensão arterial
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HPF: Hidroxifenilfluoresceína
IL-6: Interleucina 6
KCl: Cloreto de potássio
L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester
Log EC₅₀: Log da concentração de agonista que produziu metade da resposta máxima

LVM: Leito vascular mesentérico
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases* - Proteína-Kinases ativadas por mitógenos
MIF: Mediana intensidade de fluorescência
MLV: Músculo liso vascular
MMP: Metaloproteinases
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nor: Norepinefrina
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintase
•OH⁻: Hidroxila
•O₂⁻: Ânion superóxido
•ONOO⁻: Peroxinitrito
PA: Pressão arterial
PAS: Pressão arterial sistólica
PBS: Solução tampão fosfato
PDEs: Fosfodiesterases
PE50: Cânula de polietileno
PGI₂: Prostaciclina
PKA: Proteína kinase A
PKC: Proteína kinase C
PKG: Proteína kinase G
cPLA2 α : Fosfolipase A2
Rmáx: Resposta máxima
ROS: Reactive oxygen species - Espécies reativas de oxigênio
SHR: Ratos espontaneamente hipertensos
SNS: Sistema nervoso simpático
SRAA: Sistema renina-angiotensina
SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta
TXA₂: Tromboxano A2
VPR: Volume Pressure Recording
2R1C: 2 Rins-1Clip

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Doenças Cardiovasculares	20
1.1.1 Doenças cardiovasculares e hipertensão arterial	21
1.1.1.1 Estresse oxidativo e alterações morfofuncionais	27
1.2 Tratamentos farmacológicos	30
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Especificos	36
4 MATERIAIS E METÓDOS	38
4.1 Animais experimentais	38
4.2 Grupos experimentais e tratamentos	38
4.3 Verificação peso corporal, ingestão de água e volume urinário	39
4.4 Análise da hemodinâmica	40
4.5 Avaliação dos níveis plasmáticos de Angiotensina II	40
4.6 Verificação de indução de hipertrofia cardíaca	41
4.7 Estudo da função vascular	41
4.7.1 Estudo da resposta contrátil do leito vascular mesentérico	41
4.7.2 Estudo da função vascular de vasos de condutância	42
4.7.3 Mecanismo envolvidos na resposta contrátil do LVM e anéis de aorta	43
4.7.3.1 Participação do estresse oxidativo na resposta contrátil dos vasos	43
4.7.3.2 Participação do óxido nítrico na resposta contrátil dos vasos	43
4.7.3.3 Participação dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase 1	44
4.7.3.4 Participação tromboxano na resposta contrátil de anéis de aorta	44
4.7.4 Verificação das respostas obtidas na reatividade vascular	44
4.7.4.1 Análise da resposta obtida no LVM	44
4.7.4.2 Análise da resposta obtida em anéis de aorta	44
4.8 Preparo das amostras para avaliação da produção de ROS	45
4.8.1 Mesentério	45
4.8.2 Aorta	45
4.8.3 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio	45
4.9 Análise dos produtos da oxidação avançada de proteínas (AOPP)	46
4.10 Análise morfológica do vaso	47

4.10.1	Verificação da parede vascular da artéria mesentérica e aorta	47
4.10.2	Observação da superfície endotelial	47
4.11	Análise estatística	48
5	RESULTADOS	50
5.1	Peso corporal, ingestão de água e volume urinário	50
5.2	Avaliação da pressão arterial sistólica e hipertrofia cardíaca	50
5.3	Avaliação da Angiotensina II plasmática	52
5.4	Avaliação da função vascular	53
5.4.1	Angiotensina II aumenta a reatividade vascular à drogas vasoconstritoras	53
5.4.2	Influência das ROS na resposta contrátil do LVM e da aorta	54
5.4.3	Influência do óxido nítrico na contração do LVM e aorta	57
5.4.4	Avaliação dos prostanoídeos derivados da Ciclooxigenase na contração	60
5.4.5	Participação do Tromboxano A ₂ na resposta contrátil de anéis de aorta	63
5.5	Produção espécies reativas de oxigênio no LVM e aorta	65
5.6	Avaliação dos produtos de oxidação protéica	66
5.7	Análise morfológica dos vasos	67
5.7.1	Área de secção transversa da parede vascular das artérias	67
5.7.2	Análise da superfície endotelial das artérias	69
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2016), as doenças cardiovasculares (DCVs) são as principais causas de morte no mundo, matando mais do que qualquer outra doença. Em 2012, foram responsáveis pela morte de 17,5 milhões de pessoas e, dessas, 80% foram devido a infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC), acometendo principalmente países de baixa e de média renda (World Health Organization, 2014). Os riscos para as DCVs incluem fatores comportamentais, como o uso de tabaco, a alimentação não saudável, o consumo de álcool, o sedentarismo, a obesidade, a hipertensão arterial (HA), a hipercolesterolemia e o diabetes (World Health Organization, 2016).

Estima-se que, se as medidas necessárias não forem tomadas, o número de mortes por DCVs aumentarão ainda mais, ultrapassando 17,3 milhões, constatados em 2008, para 23,6 milhões em 2030, como demonstrado na figura 1, sendo as DCVs responsáveis por aproximadamente 30% das mortes no mundo (World Health Organization, 2013).

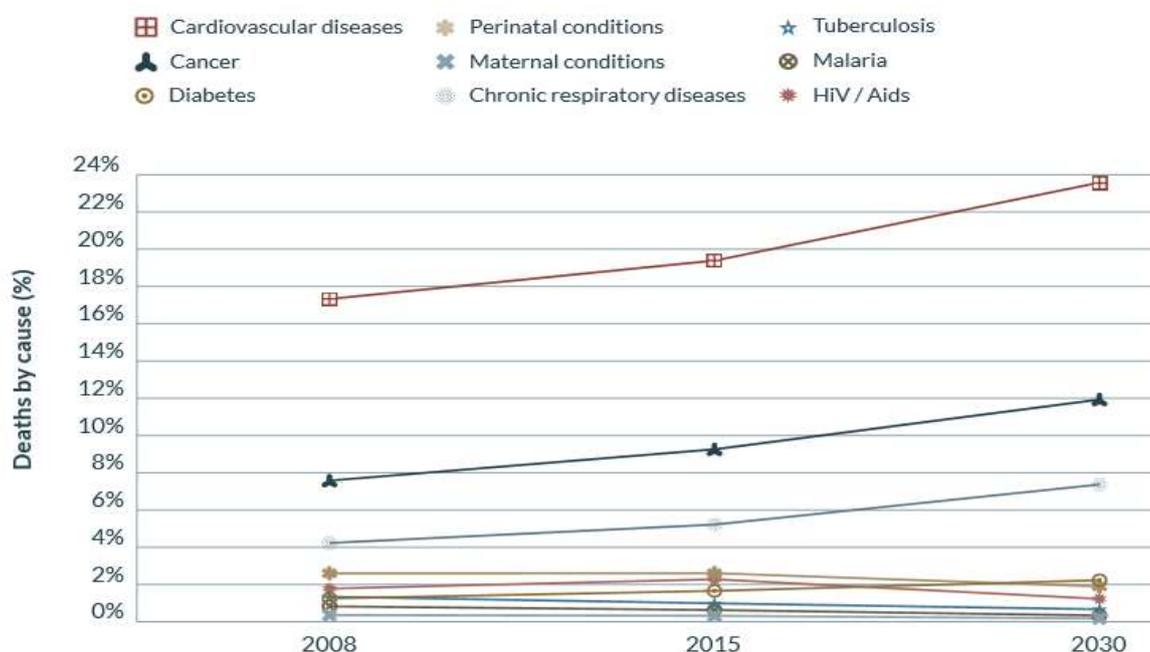


Figura 1. Gráfico demonstrando a tendência de mortes por doenças não transmissíveis e transmissíveis no mundo. (World Health Organization, 2013).

1.1.1 Doenças cardiovasculares e hipertensão arterial

Os estudos demonstram, repetidamente, uma relação forte e direta dos níveis de pressão arterial (PA) com as DCVs, considerando que, aproximadamente 26% da população adulta apresenta níveis elevados de PA, sendo observada em ambos os sexos, em todas as idades da vida adulta e em todas as principais manifestações de DCVs, incluindo AVC (isquêmico e hemorrágico), doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e doença renal (Lewington *et al.*, 2002; Rapsomaniki *et al.*, 2014), sendo assim, pesquisas que tem como objetivo avaliar os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da HA e que visam a busca de novas aplicabilidades de medicamentos disponíveis no mercado tornam-se relevantes, uma vez que podem contribuir para a redução dos riscos que favorecem ao desenvolvimento das DCVs.

O número de pessoas com HA tem aumentado significativamente, sendo atribuída ao crescimento populacional, ao envelhecimento e aos fatores de risco comportamentais, como consumo excessivo de sódio (Berger *et al.*, 2018), ingestão insuficiente de potássio na dieta, sobrepeso e obesidade (Droyvold *et al.*, 2005; DeMarco, Aroor, Sowers, 2014), ingestão de álcool e sedentarismo, além da predisposição genética (Liang Ng, Warren, Caulfield, 2018; Zheng *et al.*, 2018), portanto o aumento excessivo a todos esses fatores tem associações direta com os níveis aumentados de PA observados atualmente. Diante disso, a HA é considerada uma das principais causas de mortes que poderiam ser evitadas no mundo, entretanto, os indivíduos não se adequam a um estilo de vida saudável (Oparil *et al.*, 2018). Além disso, sabe-se que há um grande impacto na diminuição da produtividade do trabalho e da renda familiar (Abegunde *et al.*, 2007).

Segundo as VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2016), a HA sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por elevação sustentada dos níveis de PA para números acima dos valores considerados normais (PA sistólica ≥ 140 mmHg; PA diastólica ≥ 90 mmHg), considerando que a PA é definida como o produto do débito cardíaco (determinado pela frequência cardíaca multiplicada pelo débito sistólico) e da resistência vascular periférica. Sendo assim, o aumento da PA associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos, como o coração, o encéfalo, os rins e os vasos sanguíneos, e também a alterações metabólicas, com conseqüente aumento no risco do surgimento de DCVs.

A alta incidência da HA na população mundial é confirmada pelas pesquisas que tem demonstrado que aproximadamente um em cada quatro indivíduos adultos apresentam HA, considerando que cerca de 3,5 bilhões de adultos têm níveis de PA considerados ideais, ou seja, apresentam níveis pressóricos entre 110-115 mmHg e 874 milhões de adultos têm níveis de PAS \geq 140 mmHg (Forouzanfar *et al.*, 2017). No Brasil, a HA atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, atingindo mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCVs (Scala *et al.*, 2015).

As causas da HA ainda não são bem compreendidas e, na grande maioria dos casos, não resulta apenas de uma única causa, sendo assim, pode ser classificada de duas maneiras: hipertensão arterial essencial ou primária e hipertensão secundária. Sendo a hipertensão essencial, considerada como uma doença complexa e multifatorial, resultante da interação entre diversos fatores genéticos e ambientais, responsável por acometer cerca de 90 a 95% das pessoas hipertensas e a sua manifestação não pode ser atribuída à existência de outra doença precedente (Bolívar, 2013; Luft, 2001; Fagard *et al.*, 1995). Já a HA secundária atinge cerca de 5 a 10% dos indivíduos hipertensos e está associada a outros distúrbios como, por exemplo, aldosteronismo primário, feocromocitoma (um tumor neuroendócrino das glândulas supra-renais ou outros tecidos neuroendócrinos) ou estenose da artéria renal (McGregor, 1930; Gupta-Malhotra *et al.*, 2015; Campagnaro *et al.*, 2013). Um dado interessante que foi escrito na literatura é que pacientes com hipertensão secundária mais jovens, ou seja, com menos de 40 de anos respondem bem aos tratamentos, entretanto, mais de 35% dos pacientes idosos não respondem bem aos tratamentos (Streeten, Anderson, Wagner 1990; Rimoldi, Scherrer, Messerli, 2014), isso contribui de maneira significativa para redução da qualidade de vida dos pacientes idosos. Diante dessas informações, temos ainda mais claro que as buscas por alternativas medicamentosas, que podem minimizar os danos causados pela HA sobre o sistema cardiovascular são necessárias e pertinentes, na tentativa de promover um envelhecimento com qualidade de vida.

Há diversos mecanismos associados à regulação da PA, sendo influenciada por vários parâmetros do sistema cardiovascular, incluindo o volume sanguíneo e o débito cardíaco, bem como o equilíbrio do tônus arterial, que é afetado tanto pelo volume intravascular quanto pelos sistemas neuro-humorais (Oparil *et al.*, 2018). Durante o desenvolvimento da HA, podemos destacar o aumento da atividade do

sistema nervoso simpático (SNS) e a ativação de sistemas e fatores humorais, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), os fatores endoteliais como as endotelinas, óxido nítrico (NO) e as espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS) (Sagar et al., 1992; Campos *et al.*, 2010; Gomez-Sanchez *et al.*, 2010), conforme demonstrado na figura 2 (Adaptado Oparil *et al.*, 2018).

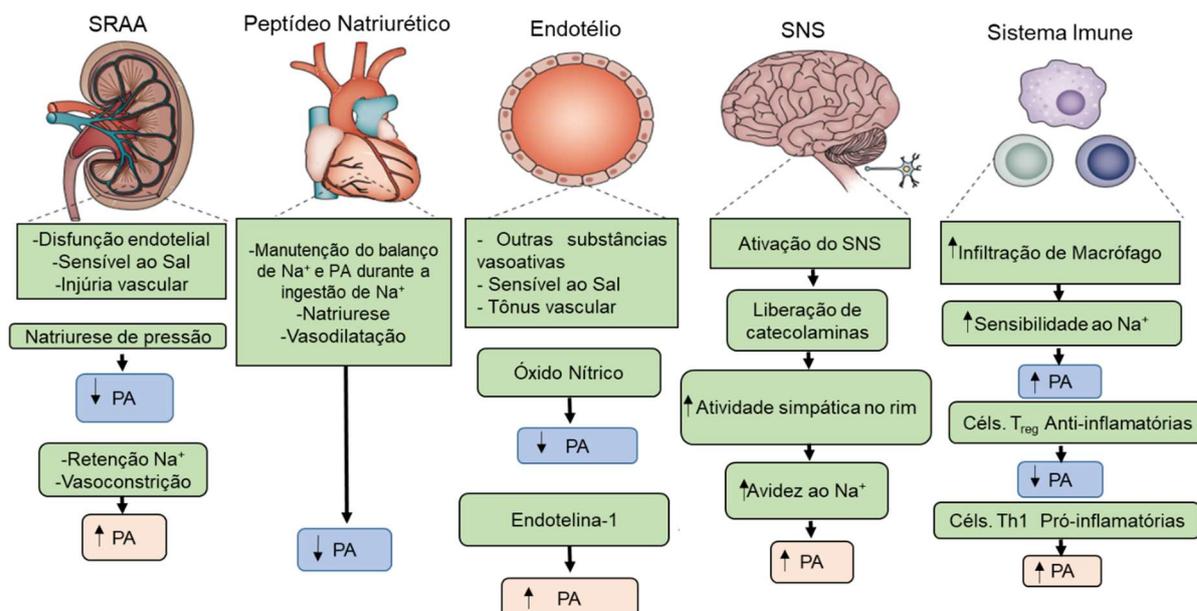


Figura 2. Sistemas envolvidos na regulação da pressão arterial. (Adaptado Oparil *et al.*, 2018).

O SRAA tem um importante papel na homeostasia cardiovascular, na regulação dos fluidos corporais, no balanço eletrolítico e, recentemente, também tem sido relatado como um regulador metabólico (De Moraes, Shanks, Zucker, 2018). O SRAA é um eixo hormonal constituído por diversos componentes, entre eles hormônios vasoativos, enzimas conversoras e diferentes tipos de receptores, com ampla distribuição no organismo e também produção local em alguns tecidos (Huber *et al.*, 2017; Biancardi *et al.*, 2017).

Desde a sua descoberta por Tigerstedt e Bergman, no final do século XIX, o SRAA vem sendo amplamente estudado e tem contribuído para o entendimento e para os avanços na medicina do sistema cardiovascular, como o desenvolvimento de drogas inibidoras desse sistema usadas na terapia anti-hipertensiva (Van, 2005; Skrbic, Igic, 2009; Suo *et al.*, 2018; Gromotowicz-Poplawska *et al.*, 2018; Sandip *et al.*, 2018; Rosano *et al.*, 2018). A caracterização do SRA teve início quando esses pesquisadores, investigando extratos de córtex renal de maneira independente da

ativação simpática, observaram uma substância hipotética que, na ocasião, foi denominada “renina”, devido a sua origem renal (Basso, Terragno, 2001).

No mesmo período, dois grupos, um americano, liderado por Irvine Page, e outro argentino, liderado por Eduardo Braum Menendez, se empenharam para investigar a renina e observaram que a mesma apresentava um potente efeito vasoconstritor *in vivo* devido a sua ação sobre o substrato denominado angiotensinogênio. A substância ativa, gerada no plasma a partir da clivagem do angiotensinogênio pela renina, foi então isolada e denominada angiotonina (Page, Helmer, 1939; Basso, Terragno, 2001). Simultaneamente, o grupo argentino, reproduzindo o modelo de hipertensão desenvolvido por Goldblatt, observou, no sangue renal, uma substância com potente efeito pressórico, de curta duração e, diferente da renina, a esse novo composto deram o nome de hipertensina (Braun-Menendez et al., 1939; Basso, Terragno, 2001). Não foi difícil concluir que a angiotonina e a hipertensina eram a mesma substância, que passou a ser chamada de angiotensina (Ang) (Basso, Terragno, 2001).

Na via clássica do SRAA, a renina circulante cliva o angiotensinogênio, sintetizado pelo fígado, em um decapeptídeo inativo, a Angiotensina I que, por sua vez, é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando um octapeptídeo, a angiotensina II (Ang II), que é o hormônio responsável pelas principais ações do SRAA na PA (Belova, 2000; Leckie, 2005; Huber *et al.*, 2017). No entanto, a Ang II pode ser clivada pelas peptidases (aminopeptidase - Amp ou dipeptidil-aminopeptidase-D - Amp) e formar respectivamente as Ang III e IV (Danziger, 2008). De maneira semelhante a Ang II, a Ang III e seus metabólitos têm papel importante na liberação de vasopressina e de aldosterona, na hiperatividade simpática e na regulação da PA (Gao *et al.*, 2014; Del Borgo *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2013). Além disso, Ang III promove redução na reabsorção de sódio e promove efeitos cardioprotetores via ativação de receptores de Ang II tipo 2 (AT2). A Ang IV tem efeitos sobre a função cognitiva, reduz a apoptose neuronal e a atividade pró-inflamatória (Paris *et al.*, 2013; Hennrikus *et al.*, 2017). Uma enzima homóloga a ECA1, denominada ECA2, além de algumas peptidases (prolil-endopeptidase, Pep e a prolil-carboxipeptidase, Pcp) estão envolvidas na clivagem de Ang II e na formação de um peptídeo conhecido como Ang 1-7 (Santos *et al.*, 2018; Santos, Ferreira, 2007). Em 2007, foi descrito que o protoncogene *Mas* é um receptor para este peptídeo e que o eixo ECA2-Ang 1-7-Mas parece compensar os efeitos cardiovasculares e renais

deletérios do SRAA clássico (Santos, Ferreira, 2007), apresentando, portanto, efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular. A Ang 1-7 foi detectada em vários tecidos, incluindo rins, coração, fígado, baço, pulmão e sistema nervoso central (Danziger, 2008; Zimmerman *et al.*, 2012).

Em condições fisiológicas, o receptor de Ang II tipo 1 (AT1) medeia os efeitos clássicos da Ang II, incluindo a manutenção do volume do fluido extracelular e da PA (Allen, Zhuo, Mendelsohn, 1999), sendo amplamente distribuído nos sistemas nervoso, endócrino, cardiovascular e renal (Li, Zhang, Zhuo, 2017). No entanto, o aumento das concentrações de Ang II, no plasma, ou aumento da expressão de receptores AT1, nos diferentes tecidos, pode resultar em vasoconstrição, em liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, em retenção de sódio pelos segmentos do néfron, em estimulação do SNS, em liberação de endotelina 1 e em aumento de estresse oxidativo (Bader, Ganten, 2008). Entretanto, o receptor AT2 parece ter efeitos opostos aos da ativação do receptor AT1, como, por exemplo, vasodilatação, inibição do crescimento celular, da diferenciação celular e apoptose, inibição do *drive* simpático e, além disso, redução da reabsorção de sódio e inibição da secreção de vasopressina (De Moraes *et al.*, 2018), conforme ilustrado na figura 3.

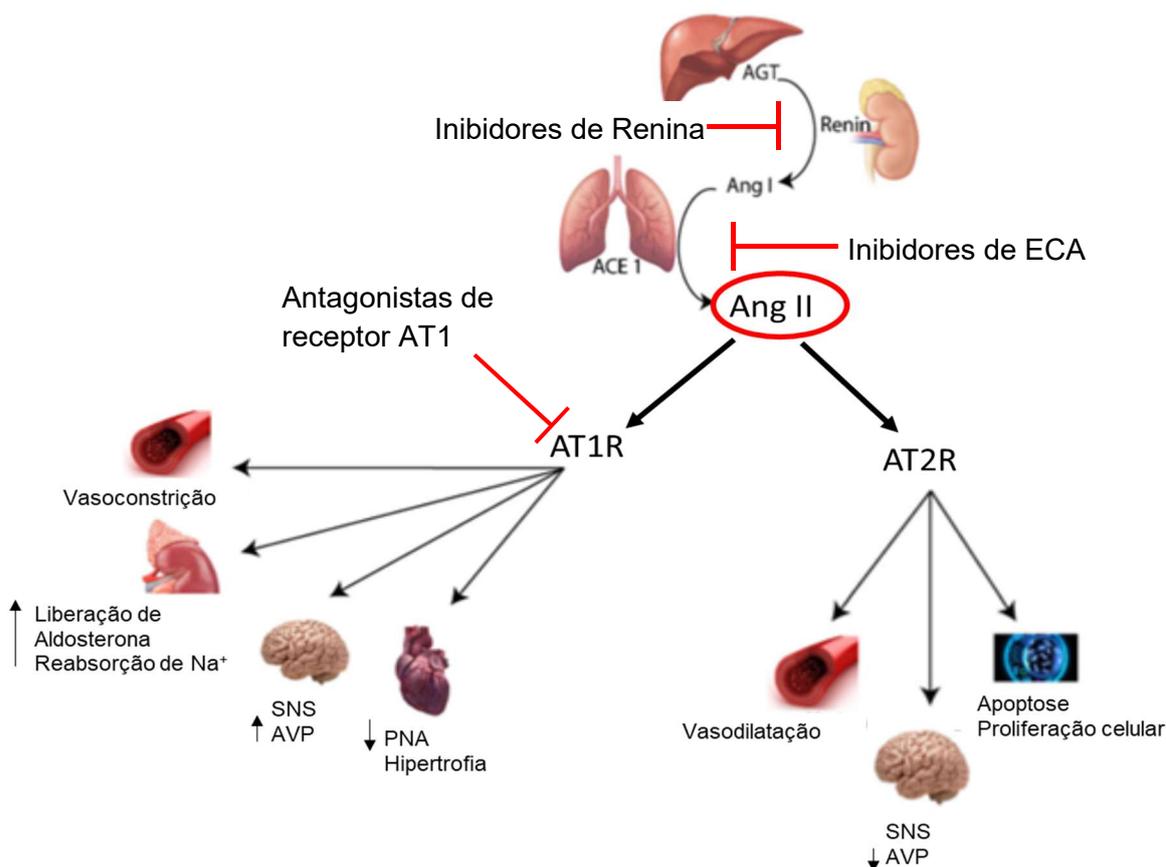


Figura 3. O sistema renina angiotensina clássico e sistêmico. ATG: Angiotensinogênio; Ang: Angiotensina; ACE: Enzima conversora de angiotensina; AT1R: Receptor AT1; AT2R: Receptor AT2; PNA: Peptídeo Natriurético Atrial; AVP: Arginina Vasopressina; SNS: Sistema Nervoso Simpático. (Adaptado De Moraes, *et al.*, 2018).

A interação da Ang II com o receptor AT1 ativa várias vias de sinalização intracelular, moduladas pelas proteínas G (especificamente, Gi, Gq12/13 e Gs) e fosfolipase C, aumentando as concentrações de cálcio no citosol e, consequentemente ativando a proteína quinase C (PKC) e a calmodulina (de Gasparo *et al.*, 2000). O receptor AT1 pode também ativar vias independentes de proteína G, como a da proteína associada ao receptor AT1 e a da β -arrestina (ambas envolvidas na internalização do receptor AT1); da Janus quinase e Serina, que ativam respectivamente, as proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição, além das quinases reguladas por sinal extracelular (Lefkowitz, Shenoy, 2005). Acredita-se que essas quinases podem estimular a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), favorecendo a geração de ROS e a síntese de proteínas, causando hipertrofia, hiperplasia e migração de células musculares lisas vasculares, hipertrofia cardíaca e deterioração renal (Kawai *et al.*, 2017).

Nos seres humanos, várias formas de hipertensão estão associadas ao aumento dos níveis plasmáticos da Ang II, tais como hipertensão renovascular e hipertensão devido a tumores secretores de renina (Lin *et al.*, 2010; Torricelli *et al.*, 2015) e estenose da artéria renal em consequência da aterosclerose (Nogueira *et al.*, 2007). Temos disponíveis no mercado diversos medicamentos para redução dos níveis pressóricos e alguns deles tem como mecanismo principal atuação sobre o SRAA, como por exemplo os inibidores da ECA e os antagonistas dos receptores AT1, como demonstrado na figura 3. Muitas pesquisas são desenvolvidas na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão e na busca de possíveis terapias que poderiam estar revertendo os danos causados pela hipertensão, com isso, o número de estudos que utilizam o modelo de infusão de Ang II é cada vez maior e mimetizam a hipertensão arterial secundária a fim de buscar alternativas para impedir os prejuízos cardiovasculares causados pelo aumento da atividade do SRA (Gomolak, Didion, 2014; Lezama-Martínez *et al.*, 2017).

1.1.1.1 Estresse oxidativo e alterações morfofuncionais vasculares

Alterações patológicas envolvendo hipertrofia e remodelamento vascular são observadas em situações em que tenho aumento dos níveis de Ang II, uma vez que estimula a migração, a proliferação e a hipertrofia das células musculares lisas e ainda induz o aumento da produção de matriz extracelular por essas células. O estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento da HA e das alterações vasculares observadas nessa doença, como, por exemplo, a disfunção endotelial, a hipertrofia e a fibrose vascular (Handy, Loscalzo, 2017; Vanhoutte *et al.*, 2016; Guzik, Touyz, 2017; Félétou *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é definido como um aumento de ROS, como, por exemplo, ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), devido ao aumento da produção ou ao metabolismo reduzido e esse aumento acarreta em vários danos vasculares, inclusive redução da biodisponibilidade do NO (Didion, 2017). Várias enzimas nas células endoteliais podem produzir $\bullet\text{O}_2^-$, dentre elas, podemos incluir a xantina oxidase, as ciclooxigenases (COX), a citocromo P450, a mieloperoxidase, a NO sintase endotelial (eNOS), quando é desacoplada pela falta de substrato L-arginina ou pela escassez de tetraidrobiopterina (BH_4) (Vanhoutte *et al.*, 2017) e também a NADPH oxidase, que é considerada uma das mais importantes fontes de ROS, tanto em células endoteliais como em musculares lisas (Lassegue *et al.*, 2003).

A Ang II se liga aos receptores AT1 e estimula a produção de ROS na parede do vaso por meio da ativação da NADPH oxidase presente na membrana, conforme demonstrado na figura 4 (Vanhoutte *et al.*, 2017). A distribuição das subunidades da NADPH oxidase, como Nox1, Nox2 e Nox 4 é dependente do tipo de célula e do tamanho do vaso, sendo que Nox 1 é uma subunidade predominante no músculo liso de vasos de condutância (Lassegue *et al.*, 2001), enquanto a subunidade Nox 2 é predominante no músculo liso de artérias de resistência (Touyz *et al.*, 2002).

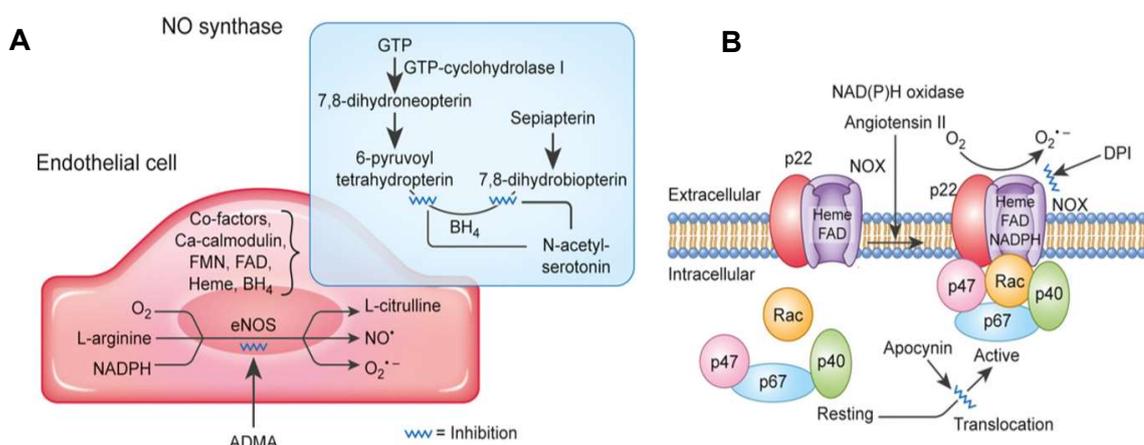


Figura 4. As duas principais fontes de ROS na parede vascular. A) Produção de NO pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) a partir do substrato L-arginina. A óxido nítrico-sintase requer NADPH, tetrahydrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e heme como cofatores. B) ativação da NADPH oxidase estimulada pela Ang II, induzindo a fosforilação e translocação da subunidade p47phox para síntese de •O₂⁻ (Vanhoutte *et al.*, 2017).

A estimulação aguda do receptor AT1 pela Ang II estimula a síntese de NO via fosforilação da eNOS (Imanishi 2006, Ramchandran *et al.*, 2006; Mollnau *et al.*, 2002). Entretanto, a infusão constante de Ang II estimula a NADPH oxidase endotelial, que passa a sintetizar maior quantidade de ROS, induzindo o desacoplamento da eNOS e favorecendo a produção de •O₂⁻ (Yan *et al.*, 2003; Mollnau *et al.*, 2002; Chalupsky, Cai, 2005). Em camundongos com deficiência de p47phox foi observado uma redução na hipertrofia da camada média da aorta induzida por infusão de Ang II (Owens *et al.*, 2010), enquanto em camundongos deficientes de NOX2, a infusão de Ang II não aumentou a produção de •O₂⁻ e ainda não foi capaz de induzir o remodelamento de artérias cerebrais, como observado em camundongos controle (Chan, Baumbach, 2013). Em trabalho desenvolvido por Carlström e colaboradores (2010) utilizando camundongos Knockout para superóxido dismutase (SOD) a hipertensão e o remodelamento vascular induzido pela Ang II foram marcantes quando comparados a

animais que expressavam a enzima. Diante dessas evidências, os trabalhos sugerem que a ativação dos receptores AT1 promovem disfunção endotelial e remodelamento vascular por aumento da produção de ROS (Kawai *et al.*, 2017).

Em condições patológicas em que se observa estresse oxidativo, níveis aumentados de $\bullet\text{O}_2^-$ podem reagir com o NO, resultando na formação de peroxinitrito ($\bullet\text{ONOO}^-$), que é uma molécula com potente ação vasoconstritora (Kossmann *et al.*, 2014; Saura *et al.*, 2014), essa reação promove uma redução significativa na biodisponibilidade do NO, que é um importante vasodilatador (Gryglewski *et al.*, 1986; Rubanyi, Vanhoutte 1986; Meyrelles *et al.*, 2011). Diversos estudos têm demonstrado que a utilização de terapias antioxidantes promove melhora significativa na função vascular *in vitro* e *in vivo*, tanto em animais (Liu *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2009; Dal-Ros *et al.*, 2011; Idris Khodja *et al.*, 2012) como em humanos (Perampaladas *et al.*, 2012; Viridis *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2012; Wray *et al.*, 2012; Fujii *et al.*, 2014).

Em 1980, Robert Furchgott demonstrou que a remoção da camada endotelial impedia o relaxamento das artérias isoladas quando estas eram expostas à Acetilcolina, este experimento foi um marco na história e possibilitou o desenvolvimento de novas pesquisas relacionadas ao controle local do tônus vascular (Vanhoutte *et al.*, 2017). As células endoteliais formam um epitélio de revestimento simples e plano que recobre a face interna dos vasos sanguíneos, conhecido como endotélio vascular. É um tecido capaz de controlar importantes funções nos vasos, incluindo a regulação do tônus vascular, a homeostasia local, os processos proliferativos, a manutenção da circulação sanguínea, a fluidez, a coagulação, a resposta inflamatória e imune (Luz *et al.*, 2005; Aversa *et al.*, 2008; Sheng, Zhu, 2018).

A regulação do tônus e da estrutura de vasos de condutância e de resistência acontece por meio da liberação contínua de vários mediadores vasoativos, com ações parácrinas e autócrinas, como o NO, as ROS, a endotelina-1, a Ang II, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, os prostanóides derivados das COX 1 e 2, como a prostaciclina (PGI_2), o tromboxano A_2 (TXA_2) e as prostaglandinas ($\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGH_2) e os ácidos epoxieicosatrienóicos (Meyrelles *et al.*, 2011; Vasquez *et al.*, 2016).

O NO produzido pelas células endoteliais tem importante papel na regulação do tônus vascular, uma vez que a vasodilatação das artérias e das veias, ocorre após a sua produção, o NO difunde-se para as células musculares lisas adjacentes, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (Denninger e Marletta, 1999). Uma

vez ativada, a GCs converte trifostato de guanosina (GTP) em guanosina-3',5'-monofostato cíclica (GMPc), que é um segundo mensageiro com diversos efeitos biológicos, dentre os quais destaca-se o relaxamento da musculatura lisa vascular (Ioakeimidis, Kostis, 2014). Entretanto, quando a capacidade das células endoteliais em sintetizar NO é reduzida e, em particular, se a propensão para produzir vasoconstritores é aumentada, a disfunção endotelial se inicia, o que parece ser o primeiro passo na cadeia de eventos que leva ao desenvolvimento de DCVs. As disfunções endoteliais associadas às DCVs também estão intimamente ligadas à ativação da COX e à estimulação do receptor de TXA₂, sendo esse um dos mecanismos importantes envolvidos processo de disfunção endotelial observados na hipertensão arterial (Vanhoutte *et al.*, 2017).

Sabe-se que a Ang II circulante tem grande importância fisiológica na regulação da PA, no tônus vascular, na hemodinâmica renal e na homeostase de eletrólitos, no entanto, quando a Ang II está aumentada, induz a HA (Cavalcanti *et al.*, 2016; Patrucco *et al.*, 2014; Thieme *et al.*, 2017), o aumento do estresse oxidativo (Campagnaro *et al.*, 2013; Fahning *et al.*, 2015), a hipertrofia vascular (Nogueira *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2015; Majeed *et al.*, 2015; Prasad *et al.*, 2016) e promove disfunção endotelial (Crowley 2014; Dias *et al.*, 2014; Gomolak, Didion, 2014; Siedlinski *et al.*, 2017). Diante das inúmeras consequências que o aumento da ativação do SRA pode provocar sobre o sistema cardiovascular, a busca por terapias que apresentam potencial para interagir com esse sistema torna-se relevante, uma vez que podem impedir os efeitos deletérios da ativação aumentada do SRA e contribuir para redução das doenças cardiovasculares.

1.2 Tratamentos farmacológicos

Mesmo com a atual disponibilidade de fármacos anti-hipertensivos, evidências demonstram que a resposta ao tratamento varia entre os indivíduos e alguns pacientes necessitam de mais medicamentos para controlar a PA do que outros. Estima-se que aproximadamente 10-20% dos indivíduos hipertensos apresentam hipertensão resistente, de acordo com a Associação Americana do Coração, a hipertensão resistente é definida quando a PA não é controlada (>140/90 mmHg) quando o paciente faz uso de 3 ou mais medicamentos, incluindo um diurético (Dudenbostel *et al.*, 2017; Calhoun *et al.*, 2008) e para obter o controle adequado da

PA o paciente necessita utilizar 4 medicamentos, sendo um diurético, quando bem tolerado pelo paciente (Calhoun *et al.*, 2008).

Diante da realidade clínica dos pacientes hipertensos, são necessários estudos que avaliem a capacidade de drogas “não-convencionais”, mas que apresentam potencial efeito anti-hipertensivo para o tratamento de pacientes com HA resistente. Neste contexto, o inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE5) surge como uma alternativa, uma vez que estudos recentes demonstram diversos efeitos cardiovasculares benéficos, sendo esses considerados efeitos pleiotrópicos, que vão além de sua ação sobre a disfunção erétil (loakeimidis, Kostis, 2014), com isso, o sildenafil tornou-se uma estratégia terapêutica para tratamento de diversas doenças cardiovasculares (Vasquez *et al.*, 2016), apresentando efeitos benéficos marcantes sobre a hipertensão arterial (Cavalcanti *et al.*, 2016; Dias *et al.*, 2014; Fahning *et al.*, 2015; Thieme *et al.*, 2017), inclusive para pacientes que apresentam HA resistente (Faria *et al.*, 2014, Santa Catharina *et al.*, 2016), diabetes (Luo *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2016) e aterosclerose (Balarini *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2013).

A PDE5 foi primeiramente identificada em tecido pulmonar de ratos e, posteriormente, em diversos outros tecidos, sendo encontrada em altas concentrações nas CMLs dos corpos carvernosos do pênis e da vasculatura pulmonar, por isso tornou-se alvo de intervenção farmacológica para tratamento de disfunção éretil e de hipertensão pulmonar (Vasquez *et al.*, 2016), sendo isolada e clonada pela primeira vez em 1980 (Francis *et al.*, 1980).

O GMPc é catabolizado pela PDE5 e a sua inibição resultará em um aumento dos níveis intracelulares de GMPc e prolongará a duração de sua ação (Sáenz, 2002; Rosen, Kostis, 2003; Mehrotra *et al.*, 2007). Os níveis de GMPc circulantes modulam a atividade endógena do NO• e, conseqüentemente, o tônus vascular. Dessa forma, seu aumento altera a via de sinalização NO•/GMPc e, conseqüentemente, promove vasodilatação, isso se deve a ativação da PKG pelo GMPc, o que leva à redução do conteúdo intracelular de cálcio, como demonstrado na figura 5 (loakeimidis, Kostis, 2014; Vasquez *et al.*, 2016).



JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A HA é um importante fator de risco para o desenvolvimento das DCVs, além disso, sabemos que a HA tem grande importância clínica, epidemiológica e socioeconômica, pois é uma condição clínica multifatorial e está associada às alterações funcionais e estruturais de diversos órgãos-alvo e também a alterações metabólicas que podem culminar em custos elevados com internações e ainda afastar e/ou diminuir a produtividade dos indivíduos em seus trabalhos, promovendo redução da expectativa e da qualidade de vida das pessoas. Portanto, torna-se relevante estudos que visam buscar tratamentos capazes de reduzir os danos causados pela hipertensão e suas consequências.

Diante do exposto e considerando que o sildenafil apresenta potencial anti-hipertensivo, uma vez que diminui as alterações vasculares e o estresse oxidativo decorrentes da HA, além de possuir ação direta sobre o SRA, a utilização deste inibidor da PDE5 surge como uma estratégia promissora no controle de DCVs, especificamente da HA, podendo ser utilizado como um coadjuvante no tratamento de pacientes que apresentam hipertensão resistente.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com sildenafil nas alterações cardiovasculares observadas na hipertensão induzida por infusão de angiotensina II.

3.2 Objetivos específicos:

Avaliar os efeitos do tratamento com sildenafil em animais submetidos à infusão de angiotensina II sobre os seguintes parâmetros:

- 1) Análise da polidipsia e da poliúria;
- 2) Avaliação hemodinâmica;
- 3) Avaliação dos níveis plasmáticos de Angiotensina II;
- 4) Avaliação da reatividade vascular do LVM à NE e da aorta à FE;
- 5) Avaliação da participação de ROS, do NO e dos prostanoídeos na resposta contrátil do LVM e da aorta;
- 6) Análise do estresse oxidativo:
 - Produção de $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{ONOO}^-$ / $\cdot\text{OH}^-$ e H_2O_2 ;
 - Produtos avançados de oxidação protéica (AOPP);
- 7) Análise morfológica vascular.



MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*), da linhagem C57 Bl/6 (C57), com peso corporal de aproximadamente 28 gramas, provenientes da Fundação de Desenvolvimento da Unicamp (Campinas, SP, Brasil) e foram mantidos na sala de passagem 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. O uso e cuidado destes animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a American Physiological Society. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA-EMESCAM Protocolo 02/2013).

Após as cirurgias, os animais foram mantidos em gaiolas individuais colocadas em estantes ventiladas onde receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como a temperatura (~22°C) e a umidade (~70%) do ambiente.

4.2 Grupos experimentais e tratamentos

Os animais foram divididos em três grupos experimentais e os tratamentos ocorreram da seguinte maneira:

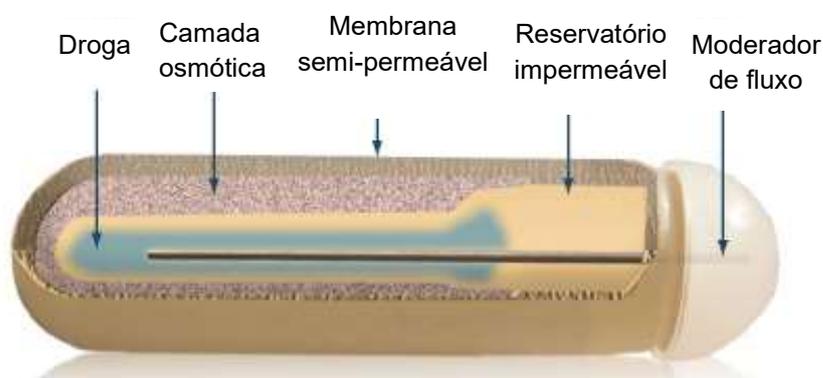
Grupos	Tratamento
Controle	Água
Ang II	Ang II (1000 ng/Kg/min) + água
Ang II sildenafil	Ang II (1000 ng/Kg/min) + Sildenafil (40mg/Kg/dia)

Para a indução da hipertensão, os animais foram submetidos a infusão de Ang II através da utilização minibombas osmóticas implantadas de maneira subcutânea, entre as escápulas. As minibombas osmóticas permitem a infusão contínua do tratamento desejado, evitando problemas em relação às alterações de concentração plasmática da droga de interesse. As minibombas funcionam por meio da diferença

de pressão osmótica entre a camada osmótica da bomba, que é revestida por sal, e o ambiente do tecido onde está implantada.

A alta osmolalidade da camada osmótica da minibomba permite a água tecidual fluir para dentro dessa através de uma membrana semipermeável que está na sua superfície exterior. À medida que a água entra nesse compartimento, comprime o reservatório, que é flexível, no qual está a Ang II, deslocando a solução utilizada no experimento para fora da bomba, por intermédio do moderador de fluxo, conforme demonstrado na figura 6. Foram utilizadas minibombas osmóticas Alzet (USA) modelo 1004, uma vez que essa garante a liberação de Ang II por 28 dias em camundongos em uma taxa de 0,11 $\mu\text{L}/\text{hora}$, que é pré-determinada pelo fabricante. Para o implante das minibombas osmóticas os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/Kg) por via intraperitoneal.

Os tratamentos com sildenafil, numa dose diária de 40mg/Kg, ou veículo (água), foram realizados por gavagem, e foram iniciados 14 dias após a indução da hipertensão por infusão de Ang II e tiveram duração de 14 dias.



Adaptação de www.alzet.com/products

Figura 6. Representação da minibomba osmótica ALZET utilizada nos experimentos em corte longitudinal para mostrar esquematicamente o seu funcionamento.

Os protocolos experimentais foram divididos e executados da seguinte maneira:

4.3 Verificação peso corporal, ingestão de água e volume urinário

Inicialmente, os animais apresentavam coletivamente um peso corporal de 28 gramas. Ao final do período experimental, os animais pertencentes aos três grupos experimentais foram novamente pesados, obtendo-se o peso corporal final (gramas).

Para verificar a ingestão de água e volume urinário num período de 24 horas, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas durante dois dias, sendo um dia para adaptação ao ambiente e o outro para verificação da quantidade de água ingerida (mL/dia) e o volume urinário excretado (mL/dia).

4.4 Análise da hemodinâmica

A análise temporal da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada através da pletismografia de cauda, uma medida indireta da pressão arterial, portanto, uma medida não invasiva. A pletismografia de cauda foi realizada através da utilização do CODA Monitor (Kent Scientific, Torrington, CT, EUA) conectado a um computador para armazenamento dos registros de pressão. Foram realizadas as medidas da PAS antes da implantação da minibomba, considerando tempo 0 e durante o período de infusão (após 7, 14, 21 e 28 dias).

O Coda monitor é um pletismografo que utiliza um cuff de oclusão que, ao insuflar, impede o fluxo sanguíneo na cauda e sofre desinsuflação lentamente. Um segundo sensor possibilita o registro de volume e pressão na cauda, sensor VPR (Volume Pressure Recording), que mede as características fisiológicas quando o fluxo sanguíneo retorna para a cauda, os dados são obtidos através do sistema de aquisição dos dados.

O registro da pressão foi realizado com os animais acordados, em repouso, em ambiente livre de ruído e mantidos sob restrição de movimento em um contentor de acrílico, com a temperatura corporal foi mantida em aproximadamente a 32°C, com auxílio de uma manta aquecedora. Foram considerados os valores obtidos em condição de ausência de movimentação espontânea da cauda do animal. Foi utilizado a média das 10 últimas medidas consecutivas. Importante ressaltar que todos os animais foram adaptados ao sistema de medida por três dias consecutivos.

4.5 Avaliação dos níveis plasmáticos de Angiotensina II

O sangue foi coletado, na presença do anticoagulante EDTA, utilizando agulha de 26-gauge e seringa de 1mL para dosagem da Ang II no plasma. O sangue foi transferido para um microtubo onde foi adicionado o Complete, mini, EDTA-free (cocktail de inibidores de protease, Roche Life Science). A amostra foi homogeneizada, centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o plasma transferido

para um criotubo e armazenado em nitrogênio líquido até o momento da dosagem por cromatografia líquida de alta performance (HPLC: High Performance Liquid Chromatography). Resumidamente, as amostras de plasma foram concentradas em coluna Sep-PackC18 (Millipore, Massachusetts, USA) ativada com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL; MiliQ). Após a ativação, as amostras foram aplicadas na coluna e o peptídeo de interesse eluído com solução de etanol: ácido acético: água (90:4:6, v/v). O eluato contendo angiotensina II foi liofilizado utilizando o Speed Vac SC 110 (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA), ressuspendido em 500 µL de ácido fosfórico 0,1% em acetonitrila 5% e filtrado com membrana 0,22 µm antes de ser injetado na coluna analítica do sistema HPLC. Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 de 7 µm (4,6x250 mm) (Applied Biosciences, Foster City, CA) utilizando um gradiente linear de 5 a 35% de fase móvel (acetonitrila em 0,1% H₃PO₄) durante 40 minutos, sob fluxo constante de 1,5 mL/min. A coluna de HPLC foi calibrada utilizando angiotensina III como padrão interno e a detecção do peptídeo foi acompanhada em absorbância de 214 nm. O tempo de retenção foi utilizado para identificar o pico de interesse, previamente determinado pela eluição de peptídeos padrão de concentração conhecida. Os cálculos foram efetuados com base na área do pico e a concentração de angiotensina II foi expressa em pg/ml de sangue. Este protocolo foi realizado no Laboratório de Rim e Hormônios da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

4.6 Verificação de indução de hipertrofia cardíaca

O coração foi retirado para verificação da hipertrofia cardíaca promovida pela Ang II e para isso, foi verificado o peso úmido do coração (mg) corrigido pelo comprimento da tíbia (cm) e pelo peso corporal (g).

4.7 Estudo da função vascular (vasos de condutância e resistência)

4.7.1 Estudo da resposta contrátil de vasos de resistência (leito vascular mesentérico)

Para avaliar a função vascular de vasos de resistência, utilizamos o leito vascular mesentérico (LVM) de acordo com protocolos realizados em trabalhos anteriores em nosso laboratório (Arruda et al., 2005; Cola et al., 2010; Dias et al., 2014; Fahning et al., 2015).

Para estudo da função vascular, os animais foram anestesiados com Tiopental (100 mg/kg), por via intraperitoneal. Após a anestesia, foi realizada uma incisão abdominal com, aproximadamente, 5 cm transversalmente, e a artéria mesentérica superior foi isolada e a artéria foi canulada com uma cânula de polietileno (PE50) preenchida com solução nutritora e isenta de bolhas. Imediatamente, o leito foi perfundido com solução nutritora (NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄.7H₂O 1.17mM; CaCl₂.H₂O 1.60 mM; KH₂PO₄ 1.18mM; NaHCO₃ 14.90 mM; EDTA 0.02 Mm; Glicose 11.10mM), mantida a 37°C e aerada constantemente por meio de borbulhamento da mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo o pH mantido a 7,4. Por meio de uma bomba peristáltica (Peri Star Pro World Precision Instruments, Sarasota, USA), foi mantido um fluxo pulsátil de 3,0 mL/min e uma pressão de perfusão média variando de 48 ± 5 mmHg. O LVM foi cuidadosamente isolado do intestino e colocado num banho de órgão. A pressão de perfusão foi medida através de um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, EUA) conectado a um amplificador e os resultados foram registrados por um sistema de aquisição de dados (BioPac Systems, Holliston, Ma, USA). Após um período de estabilização de 30 minutos, o LVM foi submetido aos testes farmacológicos para avaliação da função vascular.

Para avaliar a resposta contrátil do LVM, foram realizadas curvas dose-resposta, utilizando Norepinefrina (NOR, Hipolabor, Brasil), um agonista α -adrenérgico. A reatividade a NOR foi avaliada a partir da resposta contrátil após doses *in bolus* do agente vasoconstritor (NOR 10⁻⁷ a 10⁻³ mol/L).

4.7.2 Estudo da função vascular de vasos de condutância (aorta)

Para estudo da função vascular de vasos de condutância, utilizamos a aorta segundo o protocolo de trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório (Balarini *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2015; Leal *et al.*, 2018).

Após retirada das alças intestinais com o LVM, a aorta dos animais foi retirada cuidadosamente para avaliação da função vascular e colocada em placa de Petri contendo solução nutritora (NaCl 115 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄.7H₂O 1,2 mM; CaCl₂.H₂O 2,5 mM; KH₂PO₄ 1,2mM; NaHCO₃ 25 mM; EDTA 0,1 mM; Glicose 11.10mM). Imediatamente, o tecido conjuntivo foi cuidadosamente retirado e a aorta foi cortada em 3 anéis de aproximadamente 3 milímetros cada. Em seguida, os anéis foram acoplados, por meio do lúmen vascular, a triângulos de aço inoxidável

paralelamente. Em seguida, foram acondicionados em cubas de vidro de 5 mL de volume, contendo a mesma solução nutritiva, que foi constantemente aerada por uma mistura carbogênica com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e mantida a 37°C com auxílio de um banho-maria com circulação de água. Um dos triângulos foi fixado à parede da cuba e o outro, acoplado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica, conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100, Biopac Systems, Califórnia, EUA). Desta maneira, alterações no diâmetro vascular frente à adição de drogas vasoativas foram captadas e enviadas a um computador.

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

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

4.7.3 Investigação dos possíveis mecanismo envolvidos na resposta contrátil do LVM e anéis de aorta

Após a realização das curvas padrão com NOR - em vasos de resistência - e com fenilefrina - em vasos de condutância, foram utilizados bloqueadores farmacológicos para avaliação de possíveis mecanismos envolvidos na resposta contrátil dos vasos, ou seja, avaliamos as possíveis vias que estejam influenciando na reatividade vascular frente aos agentes vasoconstritores.

4.7.3.1 Participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) na resposta contrátil dos vasos

Para verificação da influência de ROS - produzidos pela NADPH oxidase na resposta contrátil dos vasos, foi realizado o bloqueio dessa enzima por 30 minutos com Apocinina (30µM), seguido da curva padrão com NOR e FE.

4.7.3.2 Participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil dos vasos

Para avaliar a participação do NO na resposta contrátil vascular dependente do endotélio, foi realizado - por um período de 30 minutos - o bloqueio com N^G – nitro-L-

arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-6} M), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase (NOS), seguido da curva padrão com NOR e FE.

4.7.3.3 Participação dos prostanóides derivados da Ciclooxygenase 1 na contratilidade vascular

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

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

Para avaliar se os prostanoides produzidos pelas COX-1 atua através de receptores de Tromboxano A2 (TXA2) e com isso altera a resposta contrátil de anéis de aorta, foi realizado, por um período de 30 minutos, o bloqueio com SQ-29548 ($1\mu\text{M}$), que é um antagonista do receptor de TXA2, seguido da curva padrão com fenilefrina.

4.7.4 Verificação das respostas obtidas na reatividade vascular

4.7.4.1 Análise da resposta obtida no LVM

As respostas contráteis do LVM induzida pela NOR foram expressas pela diferença de pressão de perfusão (mmHg) em relação a pressão basal que o leito apresentava anteriormente no início da curva. Foram calculados a resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e o EC_{50} , que representa a dose de NOR capaz de produzir 50% da resposta máxima, e a diferença da área abaixo da curva (ΔAUC), ou seja, área abaixo da curva sem bloqueio farmacológico – área abaixo da curva com bloqueio, que representa a influência da via investigada na resposta vasoconstritora.

4.7.4.2 Análise da resposta obtida em anéis de aorta

As respostas vasoconstritoras à FE foram expressas como porcentagem de contração em relação ao nível máximo de contração ao KCl. Para cada curva concentração-resposta, a $R_{\text{máx}}$ e o EC_{50} que representa a dose de FE capaz de produzir 50% da resposta máxima e a ΔAUC foram calculados.

4.8 Preparo das amostras para avaliação da produção de ROS

4.8.1 Mesentério

O LVM foi isolado das alças intestinais e incubado a 37°C com velocidade de 200 rpm, durante 60 minutos, em solução de extração contendo Colagenase tipo II (1000U/ml – GIBCO), dissolvida em PBS para desintegração do tecido conjuntivo. Posteriormente, o LVM foi grosseiramente triturado, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, e incubado em solução contendo Colagenase tipo I (1000U/ml - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) dissolvida em solução de Tripsina a 37°C com velocidade de 200 rpm, durante 60 minutos. Após o período de incubação, o homogenato foi filtrado através de uma membrana de nylon (BD falcon 70 µm) para remover os resíduos celulares. O filtrado foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas. Para posterior análise, as células foram ressuspensas em solução de armazenamento constituída por 95% soro fetal bovino + 5% Dimetilsulfóxido (DMSO).

4.8.2 Aorta

As aortas foram coletadas, e grosseiramente trituradas, com auxílio de uma tesoura cirúrgica e incubadas a 37°C com solução de extração contendo Colagenase tipo I (1000U/ml - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) dissolvida em solução de Tripsina e mantida em um shaker com velocidade de 200 rpm, durante 60 minutos. Após o período de incubação, o homogenato foi filtrado através de uma membrana de nylon (BD falcon 70 µm) para remover os resíduos celulares. O filtrado foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas. Para posterior análise, as células foram ressuspensas em solução de armazenamento constituída por 95% soro fetal bovino + 5% DMSO.

4.8.3 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio

Os níveis citoplasmáticos de ânions superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram analisados por citometria de fluxo em células isoladas do LVM e aorta através da intensidade de fluorescência emitida pelos marcadores dihidroetídeo (DHE) e 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA), respectivamente. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, ao entrar livremente na célula reage com o $\bullet\text{O}_2^-$ formando etídeo, o qual se intercala ao DNA amplificando a fluorescência vermelha.

Portanto, a oxidação do DHE é quantitativamente proporcional a concentração de $\bullet\text{O}_2^-$ na célula. A oxidação do DCFH-DA, um estér não fluorescente, é quantitativamente proporcional à concentração de H_2O_2 na célula. O DCFH-DA após entrar na célula, sofre 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 emitindo a fluorescência verde.

As células foram ressuspensas em 1 mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas, no escuro, com DHE (160 μM) e DCF-DA (20 mM) 30 minutos, à 37°C. Para controle positivo do DHE e DCF-DA, as amostras foram incubadas por 5 minutos com 50 μM H_2O_2 . Após incubação as células foram lavadas e ressuspensas com PBS, mantidas no gelo e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

As espécies altamente reativas, peroxinitrito/hidroxila ($\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$), foram medidas pela fluorescência emitida pelo corante hidroxifenilfluoresceína (HPF). As células foram incubadas com HPF (5 μM), por 30 minutos, a 37°C no escuro. Para controle positivo, as amostras foram incubadas com nitroprussiato de sódio (10 μM) e H_2O_2 (50 mM). Após marcação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas, em PBS para aquisição no citômetro de fluxo.

O citômetro de fluxo utilizado foi FACSCanto II (Becton Dickinson, San Juan, CA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do software FACSDiva (Becton Dickinson) e a sobreposição dos histogramas foram construídos usando o FCS Express software. Para quantificação, foram adquiridos 10.000 eventos por leitura. Para quantificação das fluorescências emitidas pelo DHE, DCF e HPF, as amostras de células foram excitadas a 488nm e os sinais foram obtidos utilizando filtros 585/42 para DHE e 530/30 para DCF e HPF.

4.9 Análise dos produtos da oxidação avançada de proteínas (AOPP)

O AOPP é gerado através da ação do estresse oxidativo sobre as proteínas e aminoácidos pela ação oxidante de clorados, principalmente ácido hipocloroso. Os níveis dos produtos de oxidação proteica, presente no plasma, foram determinados por meio da mistura de 40 μL de plasma, 160 μL de PBS, 10 μL de iodeto de potássio

(1,16M) e de 20 µL ácido acético ultrapuro, a qual foi realizada diretamente em microplaca de fundo chato. Foi realizada a leitura à 340nm, em um espectrofotômetro. A curva padrão para a realização desta leitura foi realizada utilizando-se Cloramina T (0 a 100µM). O resultado final foi expresso em µM de Cloramina T.

4.10 Análise morfológica do vaso

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

4.10.1 Verificação da área de secção transversa da artéria mesentérica e aorta

Após o período de fixação, as artérias mesentéricas e aortas foram emblocadas em resina metil-metacrilato e obtidas secções com 5 µm de espessura. Após realização dos cortes e fixadas a lâminas, as amostras foram coradas utilizando hematoxilina e eosina; e as imagens capturadas com uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha), utilizando objetivas de 40x e 100x para artéria mesentérica e de 10x e 40x para aorta. Para a análise morfométrica, foi utilizada a ferramenta “*Freehand selections*” do *software Image J* (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Para verificação da parede do vaso, foi medido a área da camada íntima e média, verificamos se houve aumento da parede do vaso pelo cálculo da diferença entre a área do vaso e a área do lúmen (área camadas média/íntima + lúmen - área lúmen). As análises histológicas e morfométricas, nos diferentes grupos experimentais, foram realizadas por um observador “às cegas”.

4.10.2 Observação da superfície endotelial

Após o período de fixação, as artérias mesentéricas e as aortas foram lavadas em tampão cacodilato (0,1 M, ~pH 7,2) e posteriormente foram mantidas em uma solução de pós fixação contendo tampão cacodilato (0,1M), tetróxido de ósmio (1,0%) e ferrocianeto de potássio (1,25%), durante 1 hora. Após esse período, o tecido foi

lavado com tampão cacodilato (0,1 M) e com água destilada. As artérias (mesentérica e aorta) foram cortadas de modo que houvesse exposição da superfície endotelial e, em seguida, passaram por processo de desidratação em etanol, utilizando diferentes concentrações (30, 50, 70, 90,100%), após período de desidratação foram processadas no ponto crítico, em que a são submetidos ao processo de secagem com CO₂. Após secagem de todo material, uma camada de ouro de 10 nm foi evaporada na superfície tecidual. Para obtenção das imagens utilizamos um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV, Jeol Inc. USA). As imagens das artérias mesentéricas foram obtidas com um aumento de x1000 e depois ampliamos 4x. As imagens das aortas foram obtidas com um aumento de x600 e depois ampliado 2x.

4.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados de reatividade vascular obtidos da aorta das curvas concentração-resposta à FE foram expressos como % de contração em relação a resposta máxima de contração ao KCl. Foi realizado ANOVA de uma via, completamente randomizada, exceto na análise temporal da PA e na comparação das curvas com NOR no LVM e com FE na aorta, em que, a ANOVA utilizada foi de duas vias para medidas repetidas. Seguido teste de *post-hoc* de Tukey. Utilizamos o software de bioestatística Prima 6.0. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.



RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Peso corporal, ingestão de água e volume urinário

Inicialmente, os animais apresentavam peso corporal estatisticamente igual, no entanto, os animais hipertensos por infusão de Ang II apresentaram redução significativa do peso corporal, quando comparado ao peso dos animais do grupo controle, conforme demonstrado na tabela 1. Não observamos influência do tratamento com sildenafil sobre a perda de peso dos animais submetidos à infusão de Ang II. Nesse grupo, a perda de peso foi semelhante ao observado no grupo de animais Ang II que receberam apenas veículo.

Na análise da ingestão de água, verificamos que os animais do grupo Ang II consumiram aproximadamente 43% a mais do volume de água diária, quando comparados aos animais do grupo controle, portanto, esses animais apresentaram polidipsia, conforme demonstrado na tabela 1. O tratamento com sildenafil demonstrou ter uma tendência na redução do volume de água ingerida, contudo a diferença não foi significativa.

O volume urinário dos animais hipertensos por infusão de Ang II, tratados apenas com veículo, foi 2,5 vezes maior, quando comparamos com os animais do grupo controle, ou seja, apresentaram poliúria, como podemos observar na tabela 1. O tratamento com sildenafil não foi capaz de alterar a poliúria que os animais submetidos à infusão de Ang II apresentaram.

Tabela 1: Análise do peso corporal, ingestão de água e volume urinário de 24 horas.

Parâmetros	Controle	Ang II	Ang II sildenafil
Peso Corporal (g)	28,7 ± 0,3	26 ± 0,4**	27,2 ± 0,4*
Ingestão de água (mL/dia)	7,7 ± 0,6	11 ± 0,9**	8,6 ± 0,6
Volume urinário (mL/dia)	1,7 ± 0,1	4,5 ± 0,7**	4,0 ± 0,5*

Os valores foram expressos como média ± EPM (8 a 10 animais por grupo). Para análise estatística, foi utilizada ANOVA 1 via. *p<0,05 e **p<0,01 vs. Controle.

5.2 Avaliação da pressão arterial sistólica e hipertrofia cardíaca

A avaliação da PAS foi realizada através da pletismografia de cauda, uma medida indireta da pressão arterial, que possibilitou o acompanhamento dos animais durante todo período experimental, permitindo a avaliação da PAS antes e durante a infusão de Ang II. Conforme demonstramos na Figura 7 A, os valores da PAS

inicialmente foram similares em todos os grupos e apresentaram coletivamente uma PAS média de $128 \pm 2,7$ mmHg, sendo considerado o dia 0 do estudo. Após 7 dias da indução da hipertensão por infusão de Ang II, os animais apresentaram aumento de 49 mmHg na PAS em relação aos animais do grupo controle. Portanto, foi possível verificar que a infusão de 1000 ng/Kg/min de Ang II promoveu aumento imediato da PAS e isso foi mantido ao longo de todo período de infusão, atingindo PAS de 186 ± 3 mmHg no final do período experimental (28 dias).

O tratamento com sildenafil foi iniciado 14 dias após a infusão de Ang II e, com 7 dias de tratamento, não observamos diferença na PAS. No entanto, podemos observar que, após 7 dias de tratamento, os níveis da PAS começaram a reduzir e, ao final do período experimental (14 dias de tratamento), verificamos uma diminuição significativa de 23 mmHg na PAS (163 ± 7 mmHg, $p < 0,05$).

A hipertrofia cardíaca é uma condição clínica esperada quando os níveis de Ang II estão aumentados por ação direta da Ang II no coração e, para analisar a existência da hipertrofia cardíaca, foi utilizado duas metodologias: o peso do coração foi corrigido pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia. Observamos um aumento de 45% e de 32% no índice de hipertrofia dos animais hipertensos por infusão de Ang II, tratados apenas com veículo, quando analisados pelo peso corporal (dados não mostrados), e pelo comprimento da tíbia, respectivamente. O tratamento com sildenafil foi capaz de promover redução significativa no índice de hipertrofia cardíaca, normalizando este índice para os níveis dos animais do grupo controle, como demonstrado na figura 7 B.

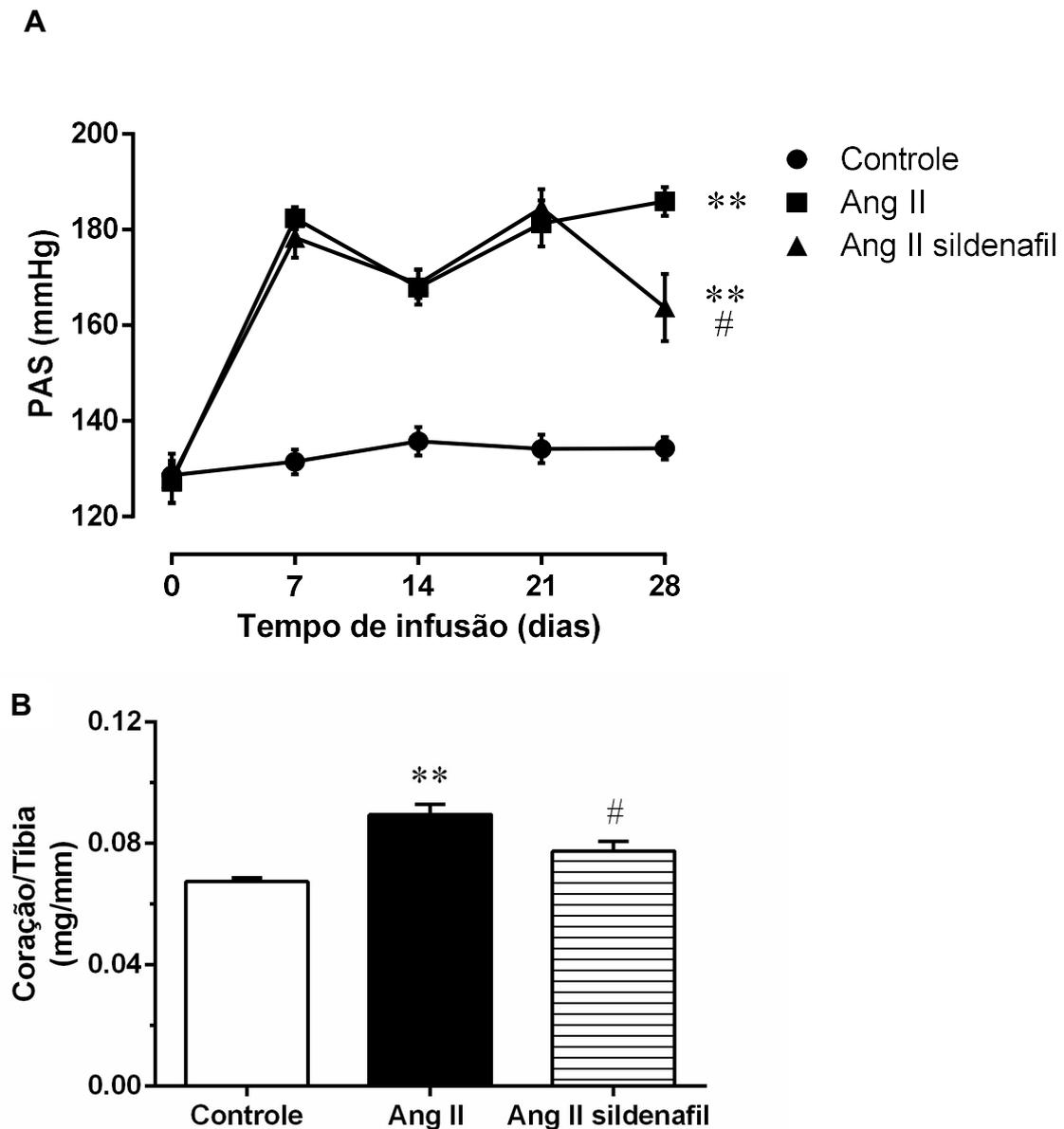


Figura 7. Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) e da hipertrofia cardíaca. A) Avaliação da PAS por pletismografia de cauda. B) Avaliação da hipertrofia cardíaca corrigindo o peso úmido do coração (mg) pelo comprimento tibia (mm). Os valores foram expressos em média \pm EPM. Para análise estatística da PAS foi utilizada ANOVA de 2 vias e ANOVA de 1 via para hipertrofia cardíaca. **p<0,01 vs. Controle e #p<0,05 vs. Angiotensina II.

5.3 Avaliação dos níveis plasmáticos de Angiotensina II

Na figura 8, observamos os níveis plasmáticos da Ang II e verificamos que, como esperado, a infusão de Ang II promoveu aumento dos níveis plasmáticos de Ang II nos animais tratados apenas com veículo quando comparados aos valores obtidos nos animais controle, sendo, possível confirmar que nosso modelo de hipertensão foi induzido com sucesso (Controle: $32 \pm 1,8$ vs. Ang II: $53 \pm 2,4$ pg/mL, p<0,01). Entretanto, o tratamento com sildenafil promoveu redução dos níveis de Ang II ($38 \pm 1,8$ pg/mL, p<0,01).

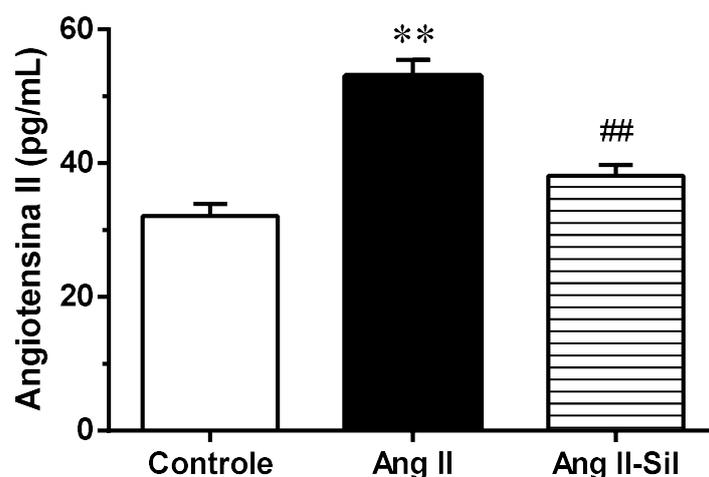


Figura 8. Avaliação dos níveis de Ang II no plasma. Os valores foram expressos em média \pm EPM. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de 1 via. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. Controle e ## $p < 0,01$ vs. Angiotensina II.

5.4 Avaliação da função vascular

5.4.1 Reatividade vascular às drogas vasoconstritoras

Na figura 9, temos representação gráfica da avaliação da função vascular do LVM e da aorta e podemos observar que os animais hipertensos por infusão de Ang II apresentaram aumento da resposta contrátil (figura 9 A e B) nos dois vasos estudados, frente à administração de NOR e de FE, respectivamente, em relação aos animais do grupo controle, ou seja, apresentaram uma hiper-reatividade às drogas vasoconstritoras, com um aumento de 70% na resposta máxima. Portanto, os resultados apresentados sugerem que a Ang II foi capaz de promover redução na liberação de fatores vasodilatadores e/ou foi capaz de aumentar a liberação de fatores vasoconstritores.

O tratamento com sildenafil foi capaz de restaurar a função endotelial, por promover a redução da vasoconstrição, e de gerar uma $R_{m\acute{a}x}$ igual a de animais do grupo controle, diminuindo, então, a hiper-reatividade apresentada pelos animais hipertensos, tratados apenas com veículo. Sendo assim, podemos inferir que o sildenafil foi capaz de promover um equilíbrio na liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores. Dessa forma, o próximo passo do presente estudo foi avaliar as possíveis vias envolvidas na hipercontratibilidade vascular e por quais vias o sildenafil estaria atuando benéficamente.

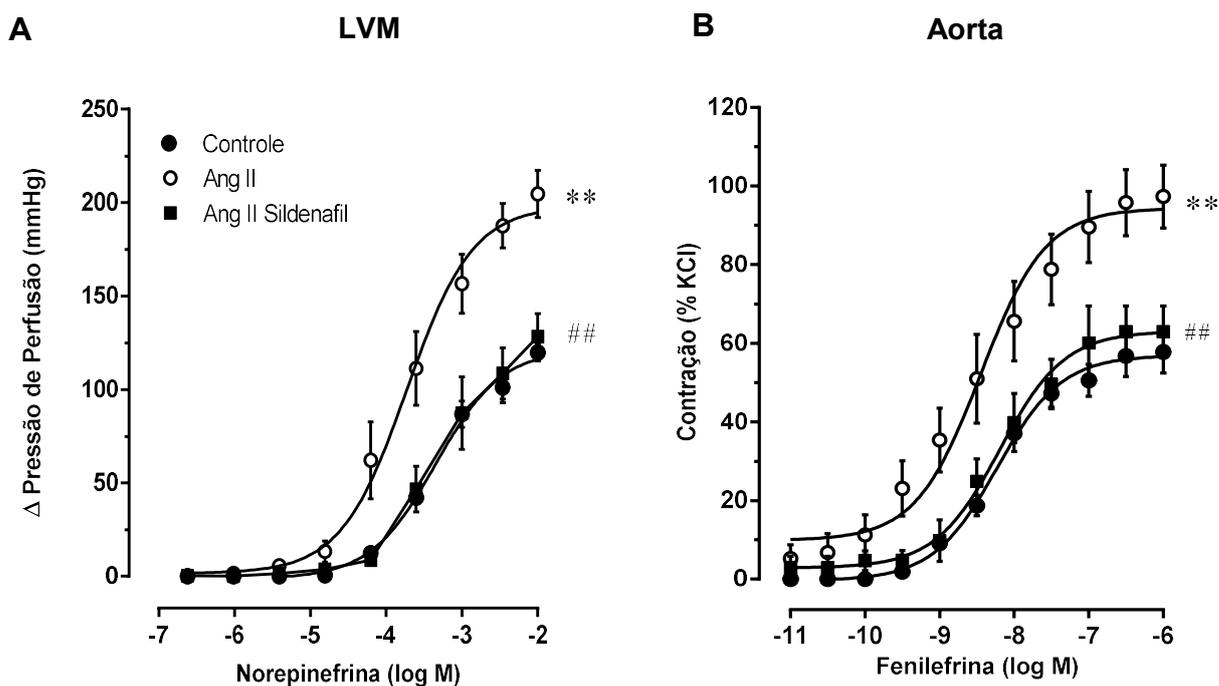


Figura 9. Avaliação da vasoconstrição em vasos de resistência e de condutância. A) Avaliação da resposta contrátil do leito vascular mesentérico (LVM). B) Avaliação da vasoconstrição de anéis de aorta. Podemos observar um aumento da vasoconstrição no LVM e em anéis de aorta dos animais hipertensos por infusão de Angiotensina II em relação aos animais do grupo controle. O tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a hiper-reatividade às drogas vasoconstritoras. Os valores foram expressos como média \pm EPM (6 a 7 animais por grupo). Para análise estatística, foi utilizada ANOVA de 2 vias. ** $p < 0,01$ vs. Controle e ## $p < 0,01$ vs. Angiotensina II.

5.4.2 Avaliação da influência das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil do LVM e da aorta

Na figura 10 A e B, podemos observar a influência de ROS na hiper-reatividade do LVM e dos anéis de aorta, ambos foram incubados previamente com apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, que é a principal enzima produtora de ROS em vasos. Possibilitando, assim, a avaliação da participação das ROS na resposta contrátil dos vasos.

Na figura 10 A, avaliamos a participação das ROS na contração do LVM e o bloqueio da NADPH oxidase promoveu uma redução significativa resposta contrátil, com diminuição da $R_{m\acute{a}x}$ no LVM dos animais hipertensos, ou seja, reduziu a hiper-reatividade apresentada à NOR. Entretanto, no grupo controle, o bloqueio da produção de ROS não promoveu alteração da contração vascular, não havendo diferença da $R_{m\acute{a}x}$. Analisando a Δ AUC, na tabela 2, podemos afirmar que as ROS derivadas da NADPH oxidase contribuem para o aumento da resposta contrátil dos

animais submetidos à infusão de Ang II, pois apresentam uma diferença significativa, sendo maior quando comparamos com a Δ AUC, obtida nos animais do grupo controle.

Verificando o efeito do sildenafil sobre as ROS, podemos inferir que o tratamento foi capaz de abolir a participação dessas espécies na contração vascular, uma vez que não observamos alteração na contração do LVM após o bloqueio da enzima NADPH oxidase no vaso. Ao analisarmos a Δ AUC, verificamos que a diferença nos animais tratados com sildenafil é significativamente menor que a apresentada pelos animais hipertensos, tratados apenas com veículo (tabela 2), sendo semelhante a apresentada por animais do grupo controle.

Na figura 10 B, avaliamos a participação das ROS na contração de anéis de aorta e observamos que a inibição da NADPH oxidase promoveu redução significativa da hiper-reatividade vascular à FE dos animais hipertensos tratados apenas com veículo, uma vez que, esses animais apresentaram redução significativa da $R_{m\acute{a}x}$ (tabela 2), dessa maneira podemos inferir que as ROS exercem um papel importante na resposta contrátil desses animais. Já nos animais do grupo controle, o bloqueio da produção das ROS não promoveu alteração na contração vascular dos anéis de aorta, mantendo a $R_{m\acute{a}x}$ semelhante a obtida antes do bloqueio (figura 10 B e tabela 2). Já em animais tratados com sildenafil, o bloqueio da NADPH oxidase promoveu redução da $R_{m\acute{a}x}$ (tabela 2) e, dessa forma, verificamos que as ROS influenciam na vasoconstrição desses animais.

Entretanto, ao analisarmos a Δ AUC (tabela 2), observamos que a magnitude de influência de ROS na reatividade vascular é diferente nos três grupos estudados, uma vez que os animais Ang II, tratados apenas com veículo, apresentaram a Δ AUC maior, quando comparados a Δ AUC do grupo controle, e os animais tratados com sildenafil apresentaram Δ AUC significativamente menor que a apresentada pelos animais Ang II tratados apenas com veículo.

Não observamos diferença significativa na sensibilidade dos vasos em estudo (tabela 2).

Portanto, diante dos resultados apresentados, podemos verificar que as ROS têm papel importante na disfunção vascular, pois promovem aumento da reatividade vascular, quando submetidos às drogas vasoconstritoras nos dois vasos de estudo dos animais hipertensos por infusão de Ang II, e que o tratamento com sildenafil foi

capaz de promover uma redução significativa na influência das ROS na resposta contrátil do LVM e de anéis de aorta dos animais tratados.

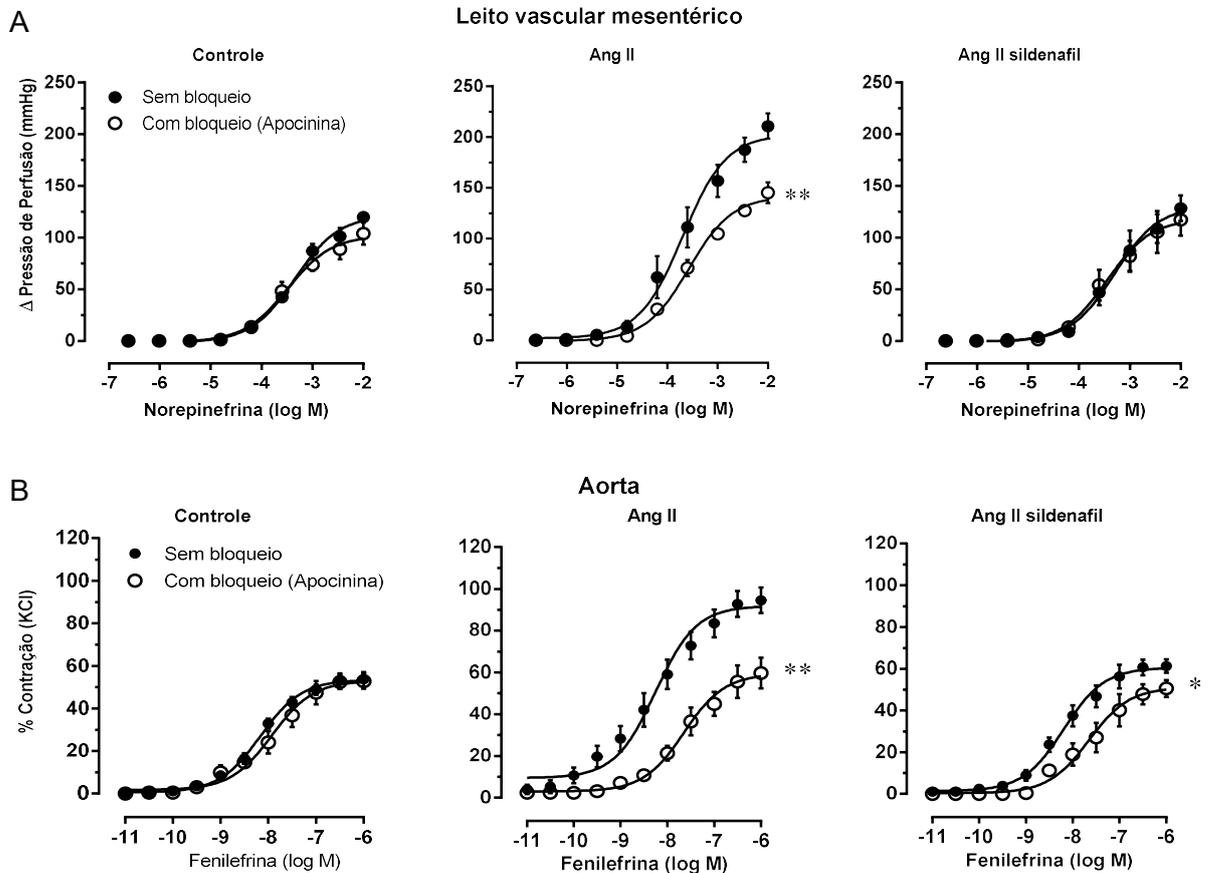


Figura 10. Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio (ROS) na contração vascular. A) Avaliação da influência de ROS na resposta contrátil do LVM. B) Avaliação da influência de ROS na vasoconstrição de anéis de aorta. Os valores foram expressos como média \pm EPM (6 a 9 animais por grupo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA de 2 vias. ** $p < 0,01$ vs. mesmo grupo na ausência de inibidor.

Tabela 2. Valores de resposta máxima (R_{máx}), sensibilidade (pEC₅₀) e da diferença da área abaixo da curva (Δ AUC) do LVM e de anéis de aorta antes do bloqueio e após bloqueio com apocinina.

Parâmetros	Controle	Ang II	Ang II sildenafil
LVM			
R_{max} (mmHg)			
Sem bloqueio	122 ± 8	212 ± 12**	139 ± 12 ^{##}
Com bloqueio Apo	103 ± 10	143 ± 7 ^{@@&}	123 ± 15
pEC₅₀			
Sem bloqueio	3,3 ± 0,05	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Com bloqueio Apo	3,5 ± 0,09	3,5 ± 0,1	3,3 ± 0,2
Δ AUC (u.a.)	-16 ± 4	-127 ± 10**	-4 ± 2 ^{##}
Aorta			
R_{max} (%)			
Sem bloqueio	53,6 ± 3,0	93,3 ± 5,7**	61,9 ± 3,1 ^{##}
Com bloqueio Apo	53,6 ± 3,1	61,5 ± 6,7 ^{@@}	53,1 ± 3,8 ^{@@}
pEC₅₀			
Sem bloqueio	8,2 ± 0,1	8,2 ± 0,1	8,1 ± 0,1
Com bloqueio Apo	7,9 ± 0,2	7,5 ± 0,2*	7,6 ± 0,2
Δ AUC (u.a.)	9,9 ± 6,7	(-)130 ± 10,6**	(-)63 ± 0,7 ^{***##}

Os valores foram expressos como média ± EPM (6 a 9 animais por grupo). **p<0,01 vs. Controle, ^{##}p<0,01 vs. Angiotensina II e ^{@@}p<0,01 vs. mesmo grupo na ausência do inibidor e [&]p<0,05 vs. Controle na presença do inibidor.

5.4.3 Avaliação da influência da biodisponibilidade do óxido nítrico na contração do LVM e aorta

Sabemos que a redução da biodisponibilidade de NO pode contribuir para o aumento da contratilidade vascular. Para avaliar a modulação do NO na contração, o LVM e os anéis de aorta foram incubados com L-NAME, inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Após o período de bloqueio, foram realizadas as curvas com doses crescentes de NOR no LVM e de FE em anéis de aorta.

Na figura 11 A, avaliamos a modulação do NO na contração LVM dos animais hipertensos tratados apenas com veículo e observamos redução da R_{máx} após bloqueio da síntese de NO (tabela 3). Já no grupo controle, o bloqueio da NOS não promoveu alteração da R_{máx}. Nos animais tratados com sildenafil observamos aumento da reatividade vascular à NOR, uma vez que apresentaram aumento da R_{máx} após bloqueio com L-NAME (tabela 3). Isso demonstra que a biodisponibilidade do NO nos animais Ang II, tratados com sildenafil, impede o aumento da contração nos vasos estudados. Curiosamente, ao analisarmos a Δ AUC, na qual se avalia o deslocamento da curva considerando a resposta obtida em todos os pontos, podemos verificar que a magnitude da participação do NO é semelhante nos dois grupos

submetidos à infusão de Ang II e é significativamente maior que a obtida no grupo controle. No entanto, a modulação do NO é diferente nos dois grupos de animais submetidos a Ang II, uma vez que, no grupo hipertenso tratado apenas com veículo após bloqueio, observamos redução da resposta contrátil; no entanto, no grupo tratado com sildenafil, observamos aumento da vasoconstrição.

No gráfico apresentado na figura 11 B, avaliamos a participação do NO na contração de anéis de aorta e verificamos que o bloqueio da síntese de NO promoveu uma diminuição na reatividade vascular à FE nos animais Ang II, tratados apenas com veículo, apresentando uma redução da $R_{m\acute{a}x}$, quando comparada com a resposta obtida na ausência de bloqueio. Diferentemente, em animais do grupo controle e Ang II, tratados com sildenafil, o bloqueio da produção de NO promoveu um aumento significativo da $R_{m\acute{a}x}$, quando foram realizadas as curvas com FE (tabela 3). Ao analisarmos ΔAUC , conforme descrito na tabela 3, observamos que o grupo controle apresentou uma ΔAUC significativamente maior em relação aos animais submetidos à infusão de Ang II, tratados com veículo ou com sildenafil. Verificando a modulação do NO nos animais hipertensos tratados apenas com veículo, observamos que o NO disponível está favorecendo a hiper-reatividade apresentada por esses animais, uma vez que o deslocamento da curva foi para baixo, com redução da resposta contrátil ($\Delta AUC (-)48,4 \pm 14$ u.a.), provavelmente, devido à conversão do NO em outras ROS, que podem atuar como potentes vasoconstritores, como por exemplo $\bullet ONOO-$. Já na análise da modulação do NO nos animais tratados com sildenafil, observamos que o bloqueio deslocou a curva de contração para cima, promovendo aumento da vasoconstrição ($\Delta AUC 174 \pm 18$ u.a), demonstrando que o tratamento com sildenafil foi eficiente em reestabelecer a participação do NO, que é o mais importante vasodilatador em vasos de condutância.

Não observamos diferença significativa na sensibilidade dos vasos em estudo (tabela 2).

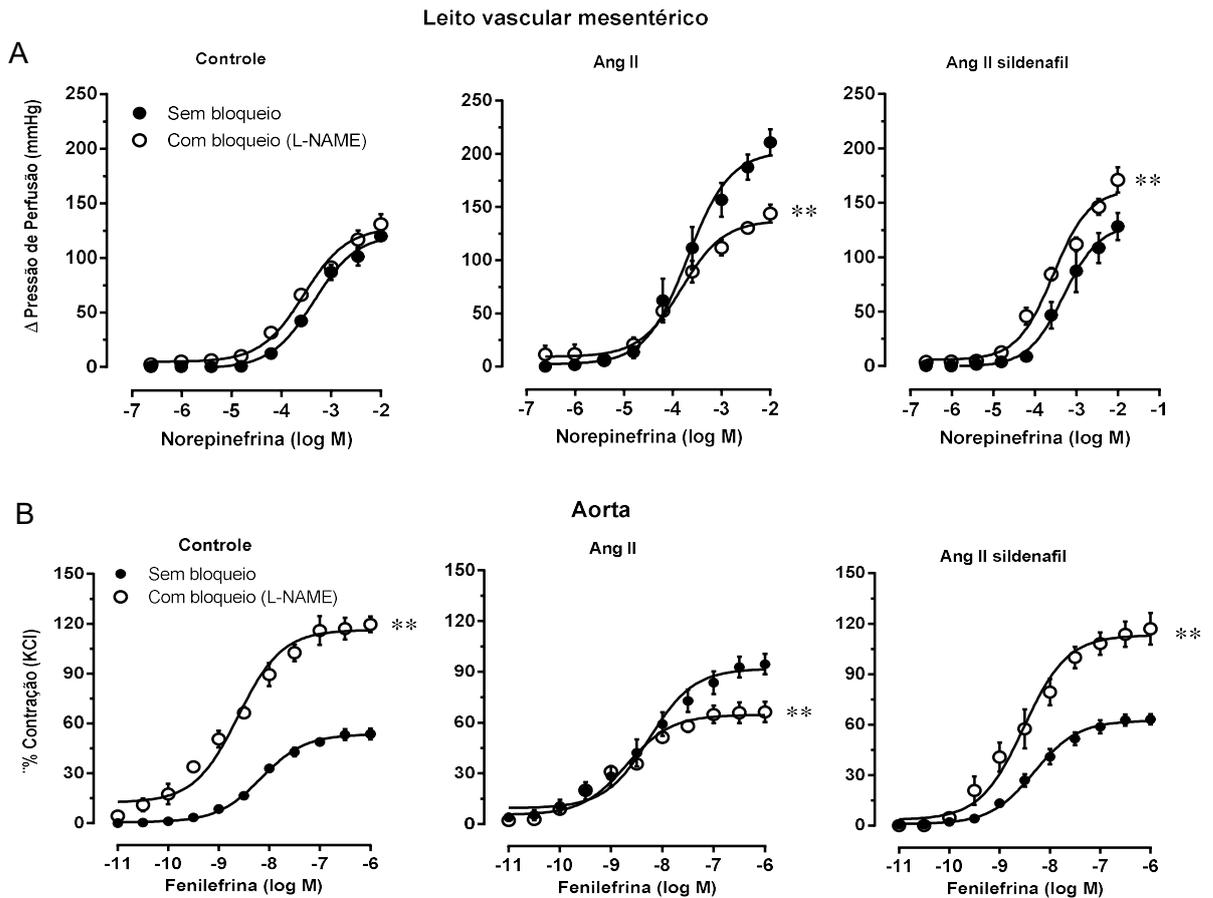


Figura 11. Avaliação da participação do óxido nítrico (NO) na contração vascular. A) Avaliação da influência do NO na resposta contrátil do leito vascular mesentérico (LVM). B) Avaliação da influência do NO na vasoconstrição de anéis de aorta. Os valores foram expressos como média \pm EPM (6 a 7 animais por grupo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA de 2 vias. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. mesmo grupo na ausência de inibidor.

Tabela 3. Valores de resposta máxima (R_{máx}), sensibilidade (pEC₅₀) e da diferença da área abaixo da curva (Δ AUC) do LVM e de anéis de aorta antes do bloqueio e após bloqueio com L-NAME.

Parâmetros	Controle	Ang II	Ang II sildenafil
LVM			
R_{máx} (mmHg)			
Sem bloqueio	122 ± 6	212 ± 12**	139 ± 12##
Com bloqueio L-NAME	129 ± 10	142 ± 8@@	163 ± 13*@@&
pEC₅₀			
Sem bloqueio	3,3 ± 0,05	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,1
Com bloqueio L-NAME	3,6 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,6 ± 0,1
Δ AUC (u.a.)	52 ± 11	(-)74 ± 11**	98 ± 13***##
Aorta			
R_{máx} (%)			
Sem bloqueio	53,6 ± 3,03	90,97±5,7**	63,02 ± 3,08##
Com bloqueio L-NAME	116 ± 6.04@@	64,7 ± 6,2@@	113 ± 7,7@@
pEC₅₀			
Sem bloqueio	8,2 ± 0,06	8,2 ± 0,15	8,2 ± 0,1
Com bloqueio L-NAME	8,6 ± 0,06	8,7 ± 0,16	8,5 ± 0,2
Δ AUC (u.a.)	248±17,15	(-)48,4 ± 14**	174 ± 18***##

Os valores foram expressos como média ± EPM (6 a 7 animais por grupo). *p< 0,05 e **p<0,01 vs. Controle, ##p<0,01 vs. Angiotensina II e @@p<0,01 vs. mesmo grupo na ausência de inibidor. &p<0,05 vs. Controle na presença do inibidor.

5.4.4 Avaliação dos prostanoídes derivados da Ciclooxygenase-1 na contração do LVM e aorta

Na figura 12 A e B, podemos observar a influência dos prostanoídes derivados da COX-1, na hiper-reatividade do LVM e em anéis de aorta. Para investigar a participação dos prostanoídes derivados da COX-1 na resposta contrátil, utilizamos o SC560 que é um inibidor seletivo dessa enzima.

Na figura 12 A, avaliamos a participação dos prostanoídes na contração do LVM e, como podemos verificar, a incubação com SC560 foi capaz de promover uma redução na R_{máx} dos animais submetidos à infusão de Ang II, tratados apenas com veículo (tabela 4). Entretanto, quando analisamos a contração vascular dos animais do grupo controle e dos animais hipertensos tratados com sildenafil, verificamos que os produtos derivados da COX-1 não participam na modulação da vasoconstrição nesses animais, já que não observamos diferença na resposta contrátil após o bloqueio.

Na análise da Δ AUC, podemos confirmar que, somente nos animais hipertensos tratados com veículo, há uma participação dos prostanoídes na resposta contrátil, uma vez que eles apresentam um aumento significativo na Δ AUC em relação aos animais do grupo controle e aos animais tratados com sildenafil. Portanto,

podemos afirmar que o tratamento com sildenafil foi capaz de reestabelecer a participação dos prostanoídes derivados da COX-1 na vasoconstrição do LVM.

Na figura 12 B, analisamos a participação dos prostanoídes derivados na COX-1, na contração vascular de anéis de aorta. Após bloqueio com SC560, observamos redução da resposta contrátil à FE nos animais hipertensos por infusão de Ang II, tratados apenas com veículo (tabela 4), demonstrando que a COX-1 participa na modulação da contração desses animais. Ao contrário do observado nos animais hipertensos, ao analisarmos os animais do grupo controle e os hipertensos tratados com sildenafil, os produtos derivados da COX-1 não participam na modulação da contração em anéis de aorta desses animais, uma vez que não observamos diferença na $R_{m\acute{a}x}$ após o bloqueio.

Verificando a ΔAUC , observamos que os animais hipertensos tratados apenas com veículo apresentam um aumento quando comparados à ΔAUC obtida pelos animais do grupo controle e pelos animais tratados com sildenafil, demonstrando que, nos animais hipertensos, há uma importante participação dos prostanoídes derivados da COX-1 na hiper-reatividade apresentada. Diante disso, podemos inferir que o sildenafil teve efeito sobre a COX-1, reduzindo a produção de prostanoídes vasoconstritores e/ou aumentando a produção de eicosanóides vasodilatadores, impedindo, com isso, o aumento da hiper-reatividade nesses animais.

Não observamos diferença significativa na sensibilidade dos vasos em estudo (tabela 4).

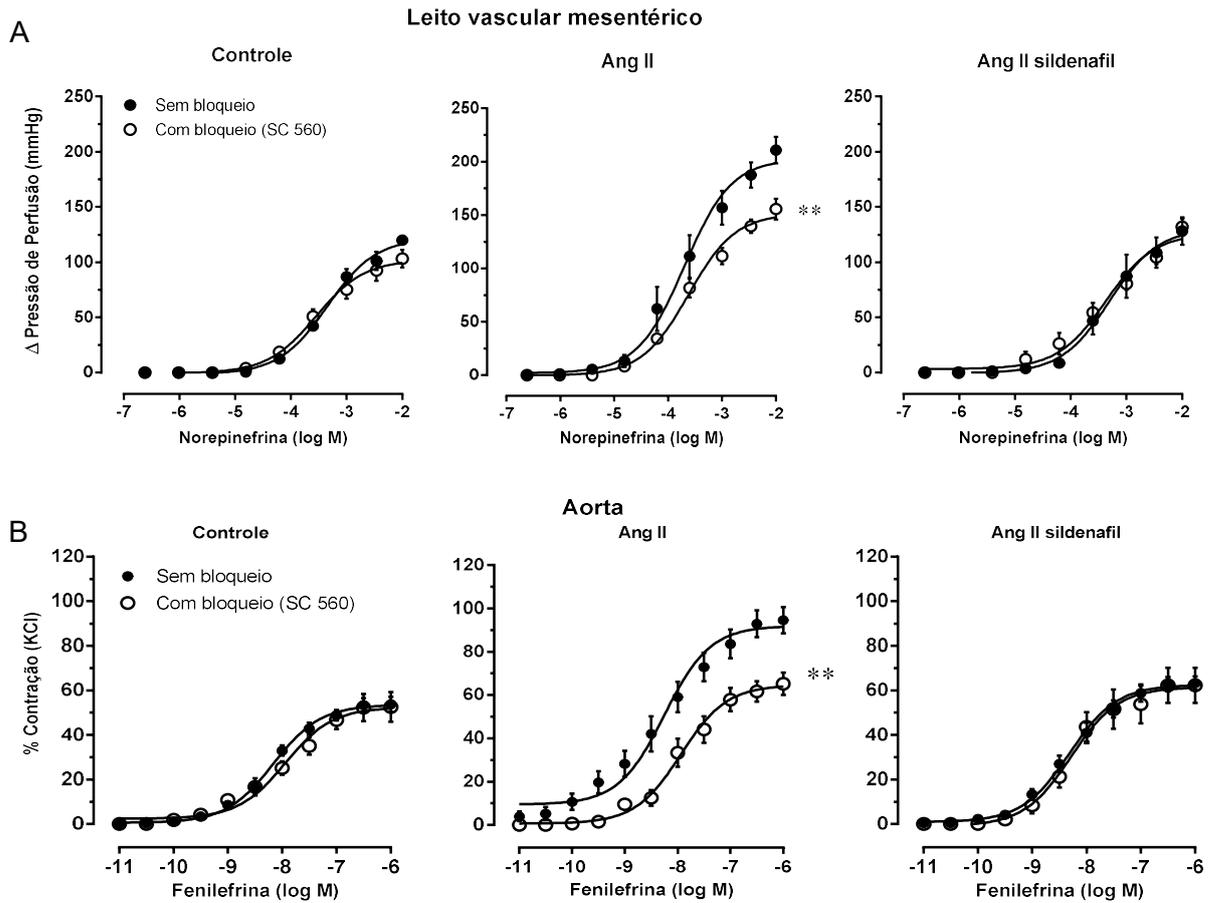


Figura 12. Avaliação da participação dos prostanoídes derivados da COX-1 na contração vascular. A) Avaliação do bloqueio com SC-560 no LVM. B) Avaliação do bloqueio com SC-560 em anéis de aorta. Os valores foram expressos como média \pm EPM (6 a 7 animais por grupo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA de 2 vias. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. mesmo grupo na ausência de inibidor.

Tabela 4. Valores de resposta máxima (R_{máx}), sensibilidade (pEC₅₀) e da diferença da área abaixo da curva (Δ AUC) do LVM e de anéis de aorta antes do bloqueio e após bloqueio com SC-560.

Parâmetros	Controle	Ang II	Ang II sildenafil
LVM			
R_{máx} (mmHg)			
Sem bloqueio	122 ± 6	212 ± 7**	139 ± 12 ^{##}
Com bloqueio SC- 560	104 ± 9	155 ± 11 ^{@@}	130 ± 9
pEC₅₀			
Sem bloqueio	3,3 ± 0,05	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,2
Com bloqueio SC-560	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,5 ± 0,2
Δ AUC (u.a.)			
SC-560	(-)4 ± 4	(-)104 ± 30**	14 ± 4 ^{##}
Aorta			
R_{máx} (%)			
Sem bloqueio	53,6 ± 3,0	90,97 ± 5,7	63,02 ± 3,1**
Com bloqueio SC-560	52,6 ± 6,5	65,8 ± 5,2*	61,5 ± 7,7
EC₅₀			
Sem bloqueio	8,2 ± 0,06	8,2 ± 0,15	8,2 ± 0,1
Com bloqueio SC-560	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,17	8,2 ± 0,04
Δ AUC (u.a.)			
SC-560	8,4 ± 4,45	(-)108 ± 11,42**	7,6 ± 13 ^{##}

Os valores foram expressos como média \pm EPM (5 a 7 animais por grupo). *p < 0,05 e **p < 0,01 vs. Controle, #p < 0,05 e ##p < 0,01 vs. Angiotensina II e @@p < 0,01 vs. mesmo grupo na ausência de inibidores.

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

Observamos, nos dados apresentados acima, que a infusão de Ang II aumenta a participação dos prostanoídes derivados da COX-1 na resposta contrátil dos animais hipertensos tratados apenas com veículo, e que esses são responsáveis por promoverem aumento da vasoconstrição em anéis de aorta. Entretanto, observamos que o sildenafil foi capaz de promover um reestabelecimento da participação dos prostanoídes na contração vascular, diminuindo a hiper-reatividade, sendo que esse efeito pode ser devido a redução dos prostanoídes vasoconstritores e/ou por aumentar a síntese de prostanoídes com ação vasodilatadora. Portanto, diante dessas evidências, utilizamos um antagonista do receptor de TXA₂ (SQ 29548), a fim de investigar se estes prostanoídes agem através da ativação dos receptores TXA₂.

Como podemos observar na figura 13, o antagonismo do receptor de TXA₂ reduziu a R_{máx} à FE somente nos animais submetidos à infusão de Ang II, tratados com veículo (tabela 5), não promovendo alteração da resposta contrátil dos animais do grupo controle e dos animais tratados com sildenafil. Os resultados obtidos nos

animais tratados com sildenafil corroboram com os observados com o bloqueio da COX-1, uma vez que observamos que o tratamento aboliu a participação desta via na resposta contrátil.

Na análise da Δ AUC, torna-se claro que os prostanoídes derivados da COX-1 atuam via receptor de TXA₂ para promover aumento da hiper-reatividade à FE nos animais hipertensos que receberam apenas veículo, pois esses animais apresentam Δ AUC maior quando comparados aos animais do grupo controle e aos tratados com sildenafil. Sendo assim, também podemos inferir que o tratamento com sildenafil diminui, de fato, a participação dos prostanoídes derivados da COX-1, em especial via ativação de receptores de TXA₂ na resposta contrátil à FE em anéis de aorta de animais submetidos à infusão de Ang II.

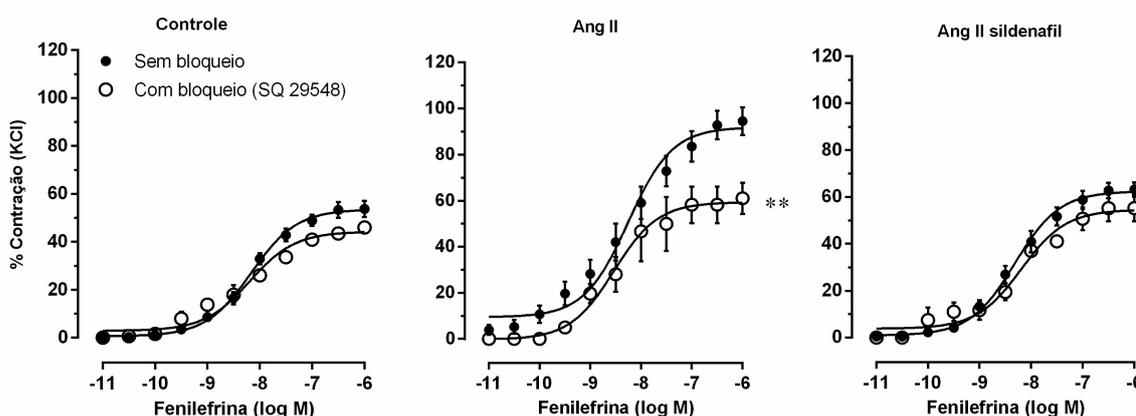


Figura 13. Avaliação da ativação do receptor de Tromboxano A₂ na contração vascular de anéis de aorta. Os valores foram expressos como média \pm EPM (6 a 7 animais por grupo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA de 2 vias. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. mesmo grupo na ausência de inibidor.

Tabela 5. Valores de resposta máxima (R_{\max}), sensibilidade (pEC_{50}) e da diferença da área abaixo da curva Δ AUC em aorta obtidos por meio de curvas concentração resposta de fenilefrina de animais do grupo controle, Angiotensina II tratados com veículo ou sildenafil sem bloqueio e após bloqueio com SQ 29548.

Parâmetros	Controle	Ang II	Ang II sildenafil
R_{\max} (%)			
Sem bloqueio	53,6 \pm 3,03	90,9 \pm 5,7**	63,02 \pm 3,08##
Com bloqueio SQ 29548	44,08 \pm 1,2	61,3 \pm 7,3@@	54,64 \pm 5,1
EC_{50}			
Sem bloqueio	8,2 \pm 0,06	8,2 \pm 0,15	8,2 \pm 0,1
Com bloqueio SQ 29548	8,3 \pm 0,17	8,3 \pm 0,25	8,2 \pm 0,03
Δ AUC (u.a.)	-16,8 \pm 2,5	-89 \pm 6,1**	-17,2 \pm 1,5##

Os valores foram expressos como média \pm EPM (5 animais por grupo). ** $p < 0,01$ vs. Controle, ## $p < 0,01$ vs. Angiotensina II e @@ $p < 0,01$ vs. mesmo grupo na ausência de inibidor.

5.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no LVM e aorta

Os níveis intracelulares de $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$ e de H_2O_2 foram quantificados pela fluorescência emitida pelos marcadores DHE, HPF e DCF, respectivamente. Ao analisarmos a fluorescência emitida pelos marcadores de estresse oxidativo nas células isoladas dos vasos em estudo, observamos que os animais submetidos à infusão de Ang II, tratados apenas com veículo, apresentaram um aumento significativo, quando comparado aos animais controle (DHE: LVM +33% e na aorta +45%, HPF: + 29% na fluorescência em ambos os vasos e DCF: LVM +37% e na aorta +21%). Portanto, podemos inferir que a Ang II promove aumento na produção de ROS e, conseqüentemente, promove aumento do estresse oxidativo (Figura 14).

Na análise dos níveis intracelulares de O_2^- e $\bullet\text{ONOO}^-/\bullet\text{OH}^-$, observamos que o tratamento com sildenafil promoveu redução significativa por apresentar uma diminuição da fluorescência emitida pelo DHE e pelo HPF, tanto no LVM quanto na aorta (Figura 14 A, B, D e E). Entretanto, não foi observado redução dos níveis de H_2O_2 nas células vasculares isoladas do LVM e da aorta, conforme demonstrado nos gráficos da figura 14 C e F. Diante da redução da fluorescência emitida pelos marcadores de estresse oxidativo, podemos inferir que o sildenafil diminui a produção de ROS e, conseqüentemente, reduz o estresse oxidativo.

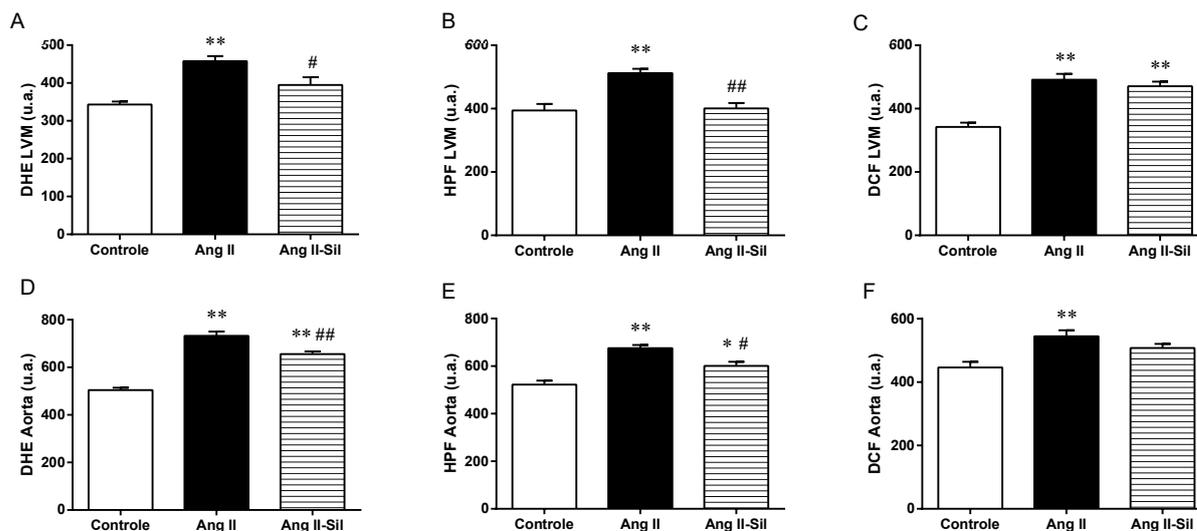


Figura 14. Avaliação da produção ROS ($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{ONOO}^-/\cdot\text{OH}^\cdot$ e H_2O_2) pela intensidade de fluorescência emitida pelo DHE, HPF e DCF respectivamente, por citometria de fluxo. A, B e C) Fluorescência emitida pelo DHE, HPF e DCF em células vasculares isoladas do leito vascular mesentérico (LVM). D, E, F) Fluorescência emitida pelo DHE, HPF e DCF em células vasculares isoladas de aorta. Os valores foram expressos em média \pm EPM (6 a 9 animais por grupo). Para análise estatística foi utilizado ANOVA de 1 via. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. Controle e # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. Angiotensina II.

5.6 Avaliação dos produtos de oxidação protéica

A análise da oxidação de proteínas plasmáticas foi realizada pelo ensaio do produto de oxidação proteica avançada (AOPP), sendo muito utilizado como um indicador de estresse oxidativo. Na figura 15, podemos observar que os animais submetidos à infusão de Ang II tratados apenas com veículo, apresentam um aumento de 50% na oxidação das proteínas plasmáticas, quando comparados com os animais do grupo controle. O tratamento com sildenafil promoveu uma redução significativa da oxidação de proteínas para níveis de animais do grupo controle, sendo capaz de reduzir o estresse oxidativo sistêmico nos animais tratados.

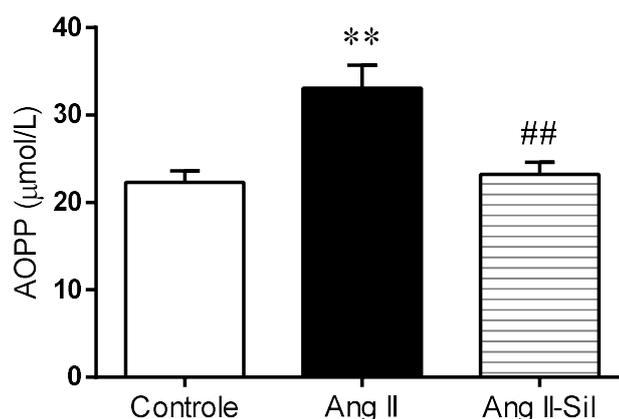


Figura 15. Avaliação dos produtos de oxidação avançada de proteínas (AOPP) plasmática. Os valores foram expressos em média \pm EPM (6 animais por grupo). Para análise estatística foi utilizada ANOVA 1 via. ** $p < 0,01$ vs. Controle e ## $p < 0,01$ vs. Angiotensina II.

5.7 Análise morfológica dos vasos

5.7.1 Área de secção transversa da parede vascular das artérias

Analisando a área de secção transversa da parede da artéria mesentérica de 2ª ordem e da aorta dos animais hipertensos por infusão de Ang II, podemos observar que os animais apresentaram um aumento da parede vascular de, aproximadamente, 2 vezes nas artérias mesentérica de 2ª ordem e de 1,6 vezes na aorta, ou seja, a Ang II promoveu uma hipertrofia da camada muscular, quando comparamos com as dos animais do grupo controle, como podemos ver na figura 16 A e C. No gráfico de barras (Figura B e D), podemos observar que o tratamento com sildenafil reduziu de maneira significativa a área de secção transversa, uma vez que observamos uma redução de 69 % hipertrofia vascular nas artérias mesentéricas de 2ª ordem e de 39% na parede da aorta.

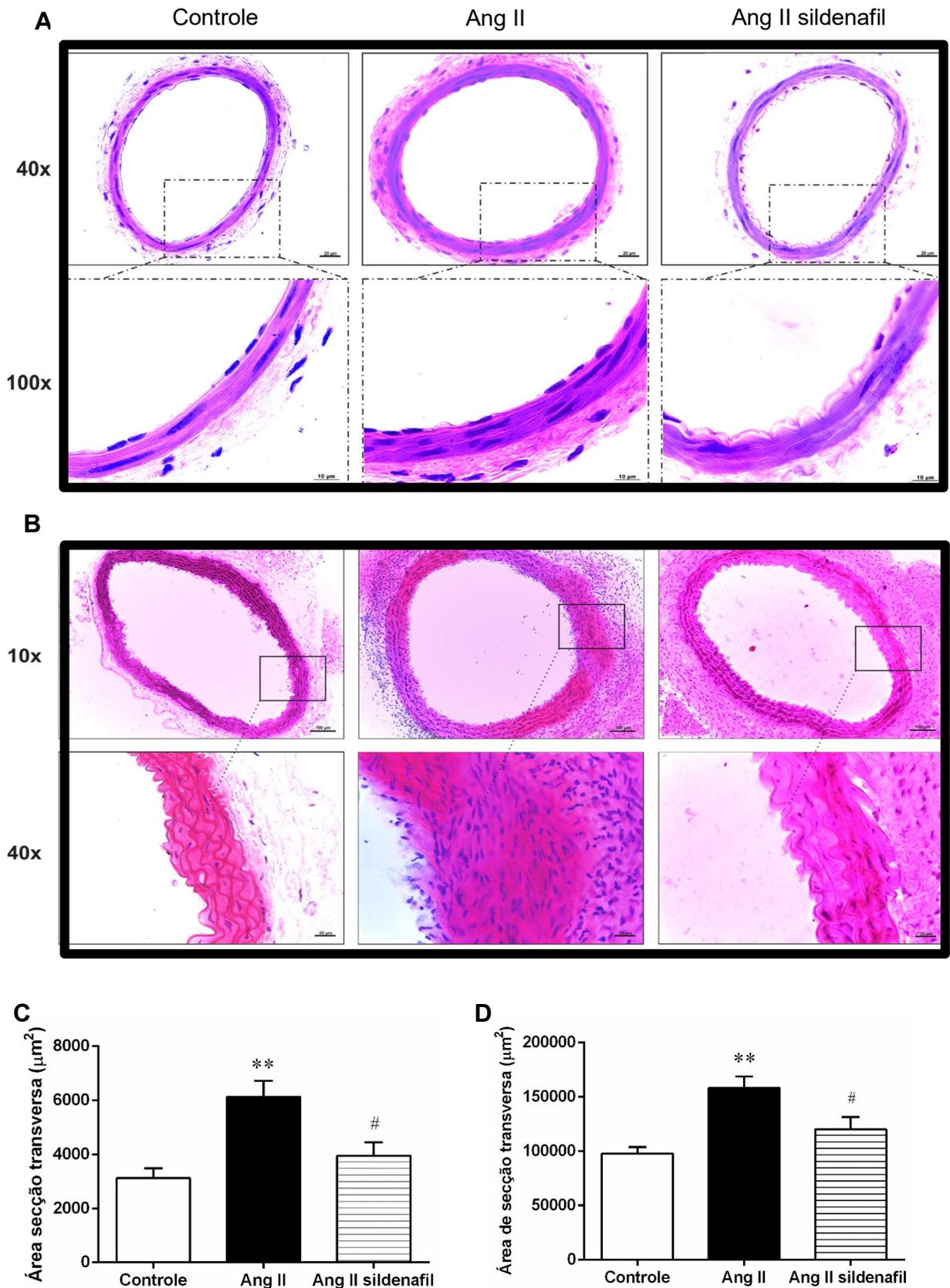


Figura 16. Avaliação da secção transversal da parede vascular com Hematoxilina e Eosina. A e B) Cortes transversais de artérias mesentéricas de 2ª ordem e aorta, respectivamente. C e D) Gráfico de barras da área de secção transversa da parede vascular. Os dados foram expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. Controle e # $p < 0,05$ vs. Angiotensina II.

5.7.2 Análise da superfície endotelial das artérias

Utilizamos a microscopia eletrônica de varredura para avaliar a integridade endotelial e, analisando as imagens típicas da artéria mesentérica de 2ª ordem (Figura 17 A e B) e da aorta (Figura 18), observamos que a Ang II promoveu uma redução marcante na espessura da camada endotelial, já que as células endoteliais estão mais isoladas, quando comparadas aos respectivos vasos dos animais controle. O tratamento com sildenafil foi capaz de reverter o dano na superfície endotelial, promovendo uma reestruturação das células endoteliais na artéria mesentérica e na aorta dos animais tratados.

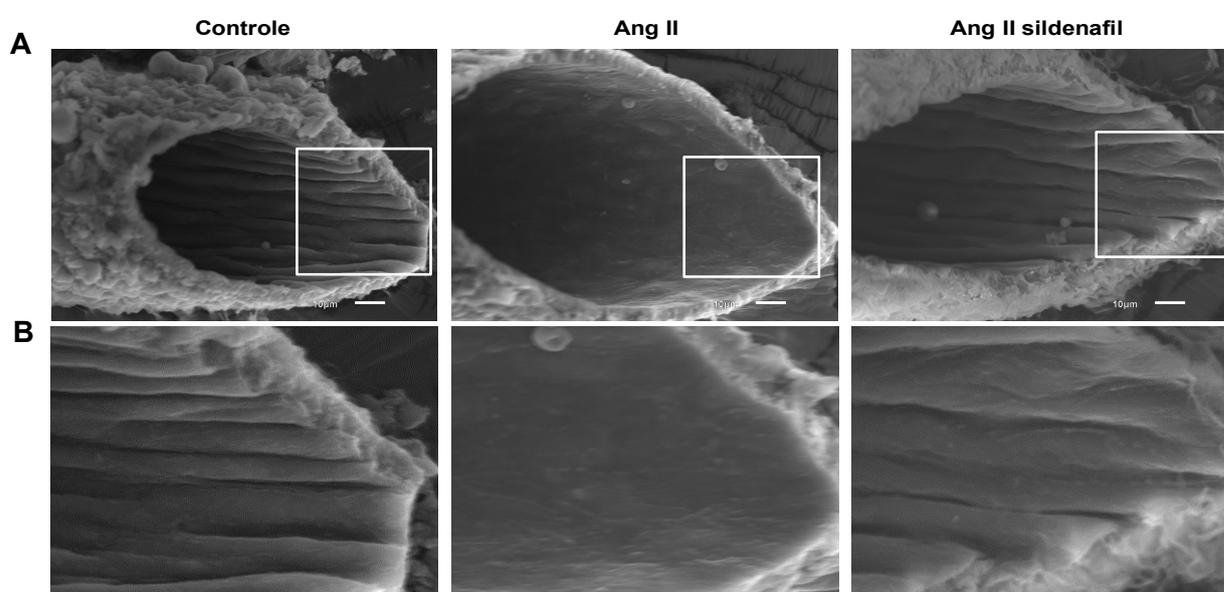


Figura 17: Fotos típicas da superfície endotelial de artérias mesentéricas (2ª ordem) por microscopia eletrônica de varredura. A) Imagens com um aumento de 1000x. B) A imagem foi ampliada 4x.

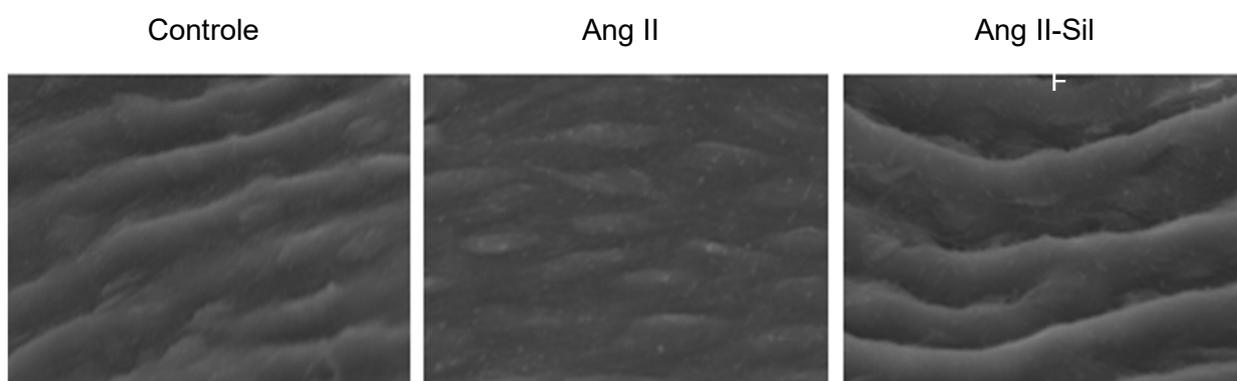


Figura 18. Fotos típicas da superfície endotelial de aorta por microscopia eletrônica de varredura. As imagens foram obtidas em aumento de 600x e depois multiplicado por 2.



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os níveis plasmáticos de Ang II aumentados foram responsáveis por promover alterações morfofuncionais importantes em órgãos alvo que compõem o sistema cardiovascular, como o aumento significativo da PA, a hipertrofia cardíaca e também demonstramos que a infusão crônica de Ang II induziu a disfunção endotelial em vasos de resistência e de condutância. Com tudo isso, nosso interesse foi avaliar os efeitos do tratamento crônico com inibidor da PDE5, nas alterações vasculares promovidas pelo aumento da Ang II e por quais vias este fármaco poderia promover seus efeitos benéficos. De maneira significativa, podemos verificar que o sildenafil foi capaz de reverter o aumento da resposta contrátil nos animais hipertensos, tanto no LVM como em anéis de aorta, e um dos principais mecanismos pelos quais podemos verificar a melhora da função vascular foi o equilíbrio na produção de ROS/NO e de prostanoides com potencial vasoconstritor e vasodilatador, além de uma menor ativação de receptores de TXA2 em anéis de aorta.

No presente estudo, observamos que a intervenção farmacológica com sildenafil, além de restaurar a função endotelial, foi capaz de reduzir significativamente a PA, a hipertrofia cardíaca, o estresse oxidativo sistêmico e intracelular e a hipertrofia vascular apresentada pelos animais hipertensos, possibilitando ainda uma reorganização das células endoteliais presente no vaso. Parte desses resultados justifica-se pela capacidade do sildenafil de reduzir os níveis plasmáticos de Ang II, conforme apresentado em nossos resultados. Diante disso, consideramos que o sildenafil apresenta, de fato, potencial efeito anti-hipertensivo, podendo ser usado principalmente como um coadjuvante no tratamento de pacientes que apresentam hipertensão resistente. É importante ressaltar que o medicamento já está disponível no mercado, portanto, os parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos são bem estabelecidos, então a investigação de novas aplicabilidade para o uso do medicamento são extremamente válidas.

A dose do sildenafil utilizada foi de 40mg/Kg/dia, de acordo com estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, que tem avaliado os efeitos pleiotrópicos do sildenafil na hipertensão renovascular (Dias *et al.*, 2014a; Dias *et al.*, 2014b; Fahning *et al.*, 2015) em animais ateroscleróticos (Balarini *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Leal *et al.*, 2015; Bernardes, *et al.*, 2016; Leal *et al.*, 2017), em animais com lesão renal aguda (De Almeida *et al.*, 2016). Além disso, esta mesma dose também foi

utilizada por outros grupos de pesquisa (Guimarães *et al.*, 2013; Guimarães *et al.*, 2015; Socala *et al.*, 2016). Apesar de existirem estudos que utilizaram dose de 100 mg/Kg/dia de sildenafil (Bilavacqua *et al.*, 2009; Thieme *et al.*, 2017), a dose utilizada em camundongos no presente estudo (40 mg/Kg/dia) é compatível com a dose que poderia ser utilizada em futuros ensaios clínicos, uma vez que corresponde a uma dose de 227 mg em um ser humano com peso corporal de 70 Kg (Reagan *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2016). Sendo assim, a dose apresentada neste estudo pode ser utilizada por seres humanos, validando uma possível aplicação translacional de nossos resultados.

Inicialmente, os animais apresentavam peso corporal semelhante, entretanto, 28 dias após a indução da hipertensão por infusão de Ang II, observamos que os animais hipertensos apresentaram perda de peso. Na literatura, observa-se que a administração crônica de Ang II promove perda de peso por diminuir a ingestão de comida (Cabassi *et al.*, 2005, Brink *et al.*, 1996), por estimular o SNA, por estimular a lipólise e por ter propriedade termogênica (Cassis *et al.*, 2004), confirmando, dessa forma, que os efeitos da Ang II a nível cerebral são importantes (Huber *et al.*, 2017). O tratamento com sildenafil não foi capaz de impedir a perda de peso dos animais tratados.

Durante o tratamento, observamos que os animais hipertensos apresentaram polidipsia, em concordância com a literatura, uma vez que a Ang II consegue atravessar a barreira hematoencefálica e atuar em receptores AT1, localizados em áreas cerebrais específicas que atuam no controle da sede e que são sensíveis a estímulos humorais associados à desidratação celular e extracelular (Johnson *et al.*, 2003). Ao mesmo tempo, a Ang II induziu poliúria, aumentando em 2,5 vezes o volume urinário dos animais submetidos à infusão de Ang II, quando comparados aos animais normotensos.

Khan e colaboradores (2016) demonstraram que níveis aumentados de Ang II resultam em aumento do influxo de cálcio em vários tipos de células renais, em liberação de ácido araquidônico (AA) e em geração de eicosanoides, que favorecem os mecanismos pró-hipertensivos renais e que contribuem para disfunção renal, para inflamação e para lesão de órgãos-alvo. No ano anterior (2015), esse mesmo grupo demonstrou que a liberação de AA, através da ativação da fosfolipase A2 (cPLA2 α) induzida por Ang II, é uma etapa limitante na biosíntese dos eicosanoides e determinante para os efeitos cardiovasculares (Khan *et al.*, 2015). Outro estudo

também demonstrou que a ativação do citocromo P450 1B1, que é expressa em tecidos do sistema cardiovascular e renal, pode metabolizar diversos metabólitos, inclusive o AA, contribuindo para disfunção renal, associada à hipertensão induzida por Ang II pela geração de ROS em camundongos (Jennings *et al.*, 2012). Entretanto, o tratamento com sildenafil foi capaz de promover apenas uma tendência em reduzir a ingestão de água, mas sem efeitos no volume urinário diário.

No presente estudo, os animais submetidos à infusão de Ang II atingiram níveis elevados de PA e o tratamento crônico com sildenafil foi capaz de reduzir em aproximadamente 13% (- 23 mmHg) os níveis de PAS, demonstrando, então, potencial efeito terapêutico sobre a hipertensão. Níveis elevados de PA atingem um número significativo de indivíduos e podem acarretar em consequências drásticas, podendo até mesmo levar a morte, sendo assim nosso resultado poderá ter grande impacto na clínica médica, contribuindo para redução dos riscos de morbidade ou mortalidade.

A redução de PA corrobora com trabalho desenvolvido por Thieme e por colaboradores (2017), que utilizaram a dose de 100 mg/Kg/dia de sildenafil, por um período de 7 dias, e verificaram redução da PA em animais hipertensos por infusão de Ang II. Essa diminuição foi associada ao aumento na via de sinalização NO/GMPc. A redução da PA também foi observada em trabalhos desenvolvidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Dias *et al.*, 2014a e b; Fahning *et al.*, 2015) e também com trabalho realizado por Guimarães e colaboradores (2013). Nesses nestes trabalhos citados acima, a redução da PA em animais 2R1C tratados com sildenafil foi associada principalmente ao efeito antioxidante do fármaco. Cavalcanti e colaboradores (2016) demonstraram que o sildenafil foi capaz de reduzir a PA de ratos 2R1C e verificaram que o tratamento melhorou o desbalanço autonômico, aumentou a sensibilidade baroreflexa no controle da PA e reduziu o estresse oxidativo sistêmico.

Em um estudo, Santa Catharina e colaboradores (2016) constataram redução da PA em pacientes com hipertensão resistente utilizando uma dose de sildenafil equivalente a utilizada no presente estudo. Portanto, os dados experimentais e clínicos demonstram o efeito anti-hipertensivo do sildenafil e sugerem que o inibidor da PDE5 pode representar uma opção terapêutica para tratamento da HA ou ser um importante coadjuvante no tratamento de pacientes com hipertensão resistente.

Outro dado importante obtido em nosso estudo, que corrobora com a diminuição da PAS, foi a redução significativa de 28% dos níveis plasmáticos de Ang

II em relação aos animais que receberam apenas veículo, considerando que a Ang II tem potente efeito vasoconstritor, sendo o principal peptídeo do SRAA responsável por aumentar a PA. Assim, podemos inferir que a redução dos níveis plasmáticos de Ang II foi um dos mecanismos pelos quais o sildenafil foi capaz de reduzir a PA, esse dado está de acordo com o que foi observado por Dias e colaboradores (2014), que, na ocasião, utilizaram camundongos 2R1C tratados com sildenafil e observaram redução dos níveis de Ang II em comparação com os animais hipertensos não tratados.

Outro efeito importante de níveis elevados de Ang II sobre o sistema cardiovascular é a indução da hipertrofia cardíaca, condição comum em pacientes hipertensos, ocasionada pelo aumento da pós-carga e/ou aumento da ativação do simpático (Campagnaro *et al.*, 2012; González *et al.*, 2016). Além disso, deve-se levar em consideração que a hipertensão e a hipertrofia cardíaca são os principais fatores para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, uma vez que induz ao remodelamento cardíaco, que é considerado um marco para o mau prognóstico dos pacientes hipertensos. Sendo assim, intervenções terapêuticas que diminuem a hipertrofia ventricular esquerda e o remodelamento estão associadas à redução da mortalidade, com consequente aumento da expectativa de vida desses pacientes (Devereux *et al.*, 2004; Wachtell *et al.*, 2007; Westermann *et al.*, 2012). Neste estudo, verificamos que o tratamento com sildenafil foi capaz de promover uma diminuição significativa da hipertrofia cardíaca observada nos animais hipertensos.

Em 2007, Nagendran e colaboradores demonstraram que, em ratos com hipertrofia ventricular direita, ocorre *upregulation* da PDE5 e a inibição dessa enzima promove aumento do GMPc no miocárdio, e isso promove a inibição da PDE3, possibilitando assim, o aumento de AMPc, que irá favorecer à ativação da PKA e, conseqüentemente, elevação dos níveis de cálcio intracelular, contribuindo para o aumento da contratilidade. Portanto, a utilização do inibidor da PDE5 tornou-se uma estratégia farmacológica interessante em condições de hipertrofia ventricular. Westermann e colaboradores (2012) realizaram o tratamento com sildenafil em camundongos com insuficiência cardíaca induzida por infusão de Ang II e verificaram que o sildenafil restaurou o RNAm e a expressão de PKG1 α (que encontrava-se reduzida pela infusão de Ang II) e de PDE5 (que estava aumentada por infusão de Ang II), com isso observaram redução da hipertrofia cardíaca e melhora na disfunção ventricular (Westermann *et al.*, 2012).

Em trabalho realizado, Patrucco e colaboradores (2014), utilizando doses diferentes de Ang II (2 mg/kg/dia, durante 7 dias) e de sildenafil (princípio ativo dissolvido na água de beber, dose ~60 a 100 mg/kg/dia), demonstraram que o tratamento teve um efeito modesto na redução da hipertrofia cardíaca em camundongos submetidos à infusão de Ang II, uma vez que o sildenafil não reduziu o aumento do tamanho de cardiomiócitos ou dos marcadores hipertróficos de miócitos, entretanto, foi capaz de promover uma redução significativa da fibrose, com redução de colágeno I, de fibronectina 1, do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e do fator de crescimento do tecido conjuntivo.

McKinsey e Kass (2007) descreveram que o aumento de GMPc e a ativação de PKG, promovidos pela inibição da PDE5, são os principais mecanismos para o sucesso da terapia com sildenafil e, considerando o amplo conhecimento clínico e as evidências de segurança dos inibidores da PDE5A, além da fácil adesão ao tratamento pela forma farmacêutica disponível, a utilização deste medicamento pode ser de fato uma estratégia terapêutica importante para a insuficiência cardíaca crônica e para a hipertrofia cardíaca causadas por níveis pressóricos elevados em humanos (Guazzi *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2012).

Os mecanismos fisiopatológicos que contribuem para o aumento da PA, causando a HA, são complexos e envolvem diversos sistemas biológicos, sendo que o sistema cardiovascular tem extrema importância e exibe alterações características, como remodelamento arterial, inflamação vascular e disfunção endotelial (Vanhoutte *et al.*, 2009, Savoia *et al.*, 2011, Montezano *et al.*, 2014). A disfunção endotelial pode promover diversas complicações na hipertensão porque o endotélio não regula somente o tônus - através da liberação de fatores vasoconstritores e vasodilatadores - e a estrutura vascular, mas também exerce efeitos anti-inflamatórios e antitrombóticos, sendo que alguns desses efeitos são, em parte, mediados pelo NO derivado do endotélio (Landmesser, Drexler, 2007). Os desequilíbrios desses fatores favorecem à perda de integridade da monocamada endotelial e podem variar de acordo com o tipo e com a duração da hipertensão desenvolvida e também com o leito vascular a ser investigado (Tang, Vanhoutte, 2010, Xiao *et al.*, 2014).

Atualmente, sabe-se que as alterações nas células endoteliais e no músculo liso vascular são influenciadas de maneira significativa pelo aumento do estresse oxidativo, ou seja, pelo desbalanço entre ROS/NO e pelo aumento na produção de citocinas inflamatórias. Essas alterações, em conjunto, provocam diferentes doenças

cardiometabólicas (Xu, *et al.*, 2009, Vukelic, Griendling, 2014, Crowley, 2014, Vasquez *et al.*, 2016) e são consideradas como causa e como consequência da PA elevada, portanto, são alvos de terapia anti-hipertensivas (Montezano *et al.*, 2015).

Na hipertensão, existem diferentes receptores e moléculas de sinalização envolvidos na hipercontratilidade ou na redução da vasodilatação, atuando de maneira prejudicial e afetando a estrutura e as propriedades mecânicas dos vasos (Avendaño *et al.*, 2014). Considerando que a Ang II tem grande influência sobre o tônus vascular e que muitos modelos de hipertensão são com base na elevação crônica dos níveis de Ang II, no presente estudo, utilizamos o modelo de hipertensão induzida por infusão de Ang II por um período de 28 dias, objetivando avaliar os efeitos do tratamento crônico com sildenafil, principalmente na disfunção endotelial observada neste modelo em vasos de resistência e de condutância e por quais possíveis vias o sildenafil estaria atuando.

Neste trabalho, observamos que a infusão de Ang II promoveu hiperreatividade a NOR no LVM e à FE em anéis de aorta, com um aumento significativo da R_{máx} (+70%) em ambos os vasos. Contudo, o tratamento com sildenafil foi capaz restaurar a função vascular, reduzindo a R_{máx} para valores iguais aos apresentados por animais controle. A novidade do presente estudo é que a restauração da função endotelial dos vasos de resistência e de condutância foi possível pela capacidade do tratamento com sildenafil promover um equilíbrio entre ROS/NO e na produção de prostanoídes vasoconstritores e vasodilatadores com menor ativação de receptores de TXA₂ em anéis de aorta.

Kopf e colaboradores (2018) também observaram aumento da reatividade vascular à NOR em anéis de aorta de animais submetidos à infusão de Ang II e descreveram que a resposta pressora da Ang II, em parte, é mediada por ações do peptídeo no SNC (Buggy *et al.*, 1977) e que a hipertensão induzida pela Ang II, a longo prazo, pelo menos em parte, acontece devido a um aumento da atividade nervosa simpática periférica (Severs, Daniels-Severs 1973; Luft *et al.*, 1989; Cox, Bishop 1991; Xue *et al.*, 2012). Avendaño e colaboradores (2014) também observaram aumento da resposta contrátil em animais hipertensos por infusão de Ang II e demonstraram que, nesses animais, ocorre uma diminuição da fosforilação de Akt e uma redução na expressão de eNOS, portanto, relacionaram o aumento da vasoconstrição a uma menor biodisponibilidade de NO.

Em estudo realizado, Gomolak e colaboradores (2014) verificaram que a hipertensão e a disfunção endotelial promovida pela Ang II é dose dependente e constataram que o aumento da PA está correlacionado ao aumento de interleucina 6 (IL-6), ao acúmulo de macrófago no vaso e ao prejuízo no relaxamento da carótida. Sabe-se que os níveis aumentados de IL-6 promovem ativação do transdutor de sinais e ativador de transcrição, que, por sua vez, diminui a atividade e a expressão de eNOS (Saura *et al.*, 2006). Além disso, a IL-6 favorece ao aumento da expressão de AT1 em células musculares e promove aumento do estresse oxidativo, contribuindo para a disfunção endotelial promovida pela Ang II, principalmente por aumentar a síntese de $\bullet\text{O}_2^-$ (Rajagoplan *et al.*, 1996, Han *et al.*, 1999, Wassmann *et al.*, 2004, Didion *et al.*, 2005, 2009; Schrader *et al.*, 2007).

Outros estudos correlacionam o prejuízo da função endotelial ao aumento da produção de ROS, sendo produzidas especialmente por aumento da atividade da NADPH oxidase e por desacoplamento da eNOS (Drummond & Sobey, 2014, Galougahi *et al.*, 2014). Alguns trabalhos têm demonstrado que a Ang II é capaz de estimular PDEs, favorecendo à degradação de GMPc e de AMPc, que são segundos mensageiros com um importante papel na função vascular (Westermann *et al.*, 2012; Bilavacqua *et al.*, 2009; Gebaska *et al.*, 2011). Utilizando o modelo de hipertensão 2R1C, nosso laboratório demonstrou que níveis aumentados de Ang II provocaram remodelamento vascular, bem como aumento na resposta contrátil de vasos resistência, sendo o aumento do estresse oxidativo um dos principais mecanismos para a disfunção endotelial (Arruda *et al.*, 2005, Nogueira *et al.*, 2007, Fahning *et al.*, 2014).

Em nossos experimentos, a hiper-reatividade à NOR e a FE, induzida pela Ang II, foi revertida após o bloqueio da NADPH oxidase com apocinina, no LVM e em anéis de aorta dos animais hipertensos tratados apenas com veículo. Já em animais tratados com sildenafil, o bloqueio da NADPH oxidase não promoveu alterações na resposta contrátil do LVM, uma vez que a hiper-reatividade à NOR havia sido totalmente abolida. Entretanto, quando avaliamos o bloqueio da NADPH oxidase em anéis de aorta, observamos uma redução na resposta contrátil, apesar da hiper-reatividade já ter sido revertida quando comparamos a contração obtida nos animais do grupo controle.

A participação do NO na resposta vascular foi avaliada por meio do bloqueio não seletivo da eNOS, com LNAME, e foi possível observar que a inibição da síntese

do NO promoveu efeitos opostos nos dois grupos de animais hipertensos. No grupo de animais que receberam apenas veículo, observamos uma redução significativa da resposta contrátil, indicando que a eNOS estava promovendo aumento da contração nestes animais. Nosso dado corrobora com alguns estudos que mostram que a Ang II pode induzir a síntese de $\cdot\text{O}_2^-$ por promover o desacoplamento da eNOS, reduzindo a síntese de NO (Saura *et al.*, 2014, Gonzalez-Vicente *et al.*, 2016), e também pela reação do NO com $\cdot\text{O}_2^-$, que está sendo produzido em quantidade excessiva, resultando na formação de $\cdot\text{ONOO}^-$, que é uma molécula potencialmente vasoconstritora. O contrário foi observado nos animais do grupo tratado com sildenafil, uma vez que, após bloqueio com LNAME, observamos um aumento da reatividade vascular, quando foram feitas as curvas com agonistas adrenérgicos, indicando que a inibição da PDE5 pode favorecer a atividade normal eNOS, produzindo seu principal produto, o NO, que é um importante vasodilatador, este efeito também foi descrito em outros trabalhos (Nagayama *et al.*, 2009, Vasquez *et al.*, 2016). Portanto, o aumento da biodisponibilidade do NO e a redução na produção de $\cdot\text{ONOO}^-$ explica, pelo menos em parte, a redução da hiper-reatividade apresentada pelos animais tratados com sildenafil.

Os prostanoídes derivados do ácido araquidônico assumem um papel importante na regulação local do tônus vascular, tanto em situações fisiológicas quanto em estados patológicos, e evidências indicam que o TXA2 participa tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da hipertensão arterial. Além disso, as pesquisas demonstram que as ROS podem estimular a COX-1 presente no músculo liso vascular, favorecendo à síntese de prostanoídes que, por sua vez, ativam receptores de tromboxano, (Tang, Vanhoutte, 2009), além de diminuir a disponibilidade do NO, modulando de maneira indireta o tônus vascular (Paravicini & Touyz, 2008). Para confirmar esta hipótese em nosso modelo experimental, realizamos o bloqueio da COX-1 com SC-560, no LVM e em anéis de aorta e observamos, de fato, que nos animais hipertensos, temos uma influência significativa dos prostanoídes derivados da COX-1 na hiper-reatividade vascular, tanto no LVM quanto em anéis de aorta.

Afim de verificar se os prostanoídes derivados da COX-1 estariam atuando através de receptores de TXA2, promovendo aumento da resposta contrátil, utilizamos o SQ29458 em anéis de aorta, verificamos que o antagonismo do receptor de tromboxano reverteu a hiper-reatividade apresentada pelos animais hipertensos por

infusão de Ang II, tratados apenas com veículo. Entretanto, nos animais hipertensos tratados com sildenafil, não observamos diferença na resposta contrátil dos vasos, quando realizamos o bloqueio com SC-560 e com o antagonista do receptor TXA2. Estudos demonstram que os prostanoídes vasoconstritores podem promover um *Upregulation* da NADPH oxidase, diminuindo conseqüentemente a biodisponibilidade de NO e a vasodilatação (Leal *et al.*, 2017; Ellinsworth *et al.*, 2014), contudo, observamos que o tratamento com sildenafil foi capaz de promover restauração da função endotelial e, nos animais tratados, tivemos redução da participação dos prostanoídes na contração vascular, sendo esse um importante mecanismo para redução da hiper-reatividade aos agonistas adrenérgicos.

Kiss e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos do sildenafil na hipertensão pulmonar e descreveram que os níveis elevados de GMPc, principalmente através da ativação de uma proteína G (Marathe *et al.*, 2012), são capazes de diminuir a ativação de MAPK e a translocação de NF- κ B, considerando esses efeitos benéficos independentes ou adicionais ao seu principal efeito vasodilatador.

Corroborando com nossos dados discutidos acima e com a hipótese de que o excesso de ROS provocam aumento da resposta contrátil dos vasos - quando submetidos aos agonistas adrenérgicos -, observamos níveis aumentados de ROS ($\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 e $\bullet\text{ONOO}^-/\text{OH}^-$), quando analisamos os níveis intracelulares através da citometria de fluxo. Diante dos resultados obtidos, verificamos que o tratamento com sildenafil reduziu a produção de $\bullet\text{O}_2^-$ e de $\bullet\text{ONOO}^-/\text{OH}^-$, sendo esse um dos mecanismos pelos quais os animais tratados apresentaram resposta contrátil igual a de animais controles, isso foi observado no LVM e em anéis de aorta. Trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa, que utilizaram outros modelos de estresse oxidativo, demonstraram o efeito antioxidante do sildenafil, prevenindo dano ao DNA do fígado e de células mononucleares (Rodrigues *et al.*, 2013) e também a restauração da função endotelial de aorta de camundongos ateroscleróticos, por diminuir a atividade da NADP(H) oxidase e aumento da biodisponibilidade de NO nesses animais (Balarini *et al.*, 2013).

Outros trabalhos também demonstraram que o sildenafil tem efeito antioxidante, sendo capaz de inibir a NADPH oxidase (Luo *et al.*, 2011, Guimarães *et al.*, 2013, Musicki *et al.*, 2014). Em trabalho realizado, Koupparis e colaboradores (2005) demonstraram que o aumento de GMPc, promovido pela inibição da PDE5, inibiu a atividade e a expressão da NADPH oxidase, principalmente da subunidade

p47phox, com isso, reduziu a produção de ROS e conseqüentemente aumentou a biodisponibilidade do NO.

Alterações estruturais induzidas pela HA, em resposta a estímulos mecânicos e humorais, são bem descritas na literatura (Korsgaard & Mulvany, 1988, Parker *et al.*, 1998, Intengan *et al.*, 1999, Prasad *et al.*, 2016, Martínez-Revelles *et al.*, 2017). Essas alterações, conhecidas como “remodelamento”, são consideradas um processo complexo que pode envolver um aumento (hipertrofia), uma diminuição (hipotrofia) ou uma reorganização (eutrofia) dos componentes da parede do vaso (Mulvany, 2002). É importante considerar o trabalho pioneiro de Folkow, no modelo SHR, que demonstrou que a alteração morfológica do vaso antecede a resposta vascular alterada, bem como o aumento sustentado da PA (Folkow, 1975).

Neste estudo, observamos que os animais hipertensos por infusão de Ang II apresentaram aumento na área secção transversa e as células endoteliais apresentaram-se mais isoladas. Esses achados corroboram com pesquisas que demonstraram que a hipertensão crônica favorece às alterações vasculares, sendo que o aumento de Ang II está associado ao processo de remodelamento e tem sido diretamente correlacionado com eventos cardiovasculares adversos em pacientes com hipertensão. Sendo assim, estudos que investigam tratamento para essas condições têm grande relevância clínica (Nogueira *et al.*, 2007, 2015, Potthoff *et al.*, 2016, Prasad *et al.*, 2016, Kopf *et al.*, 2018).

Muitos fatores têm sido propostos para explicar as alterações vasculares que ocorrem na hipertensão, sendo o aumento dos níveis de Ang II um dos principais estímulos para o crescimento da camada média dos vasos e pode envolver processo de hipertrofia ou hiperplasia das CML vascular (CMLV), assim como aumento na deposição de proteínas da matriz extracelular (Intengan & Schiffrin, 2000, Korsgaard & Mulvany, 1988). Sabe-se que as proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno e a elastina, além de estarem envolvidas na modulação estrutural das artérias, também regulam as propriedades mecânicas do vaso (Briones, Arribas, Salaices, 2010).

De fato, a Ang II, além de contrair as CMLV, tem a capacidade de promover muitos processos nos tecidos que compõem o sistema cardiovascular, incluindo crescimento celular, migração, diferenciação e apoptose (Touyz, 2005). Um estudo desenvolvido por Briones e colaboradores (2009) utilizando animais submetidos à infusão de Ang II e tratados com atorvastatina, observaram diminuição do estresse

oxidativo, com redução da expressão da subunidade NOX-1 da enzima NADPH oxidase e do colágeno nas artérias mesentéricas, sem redução da PA elevada induzida por Ang II, demonstrando que os alguns danos promovidos pela Ang II são devidos à produção de ROS.

Em estudo realizado, Potthoff e colaboradores (2016) demonstraram que os danos cardiovasculares provocados por aumento da Ang II são mediados pela ativação da p38 MAPK, que desempenha um papel crucial no aumento da PA e no remodelamento vascular. Utilizando animais hipertensos por infusão de Ang II e tratados com inibidor da p38 MAPK, observaram redução da hipertrofia vascular, com uma redução significativa na expressão de metaloproteinases (MMP1 e MMP9) em aorta, promovendo um efeito importante, uma vez que as metaloproteinases participam do processo de deposição de colágeno, favorecendo à fibrose e ao aumento da rigidez arterial, causando, conseqüentemente, aumento da PA (Thomas, Newby, 2009, Dayer, Stamenkovic, 2015, Potthoff *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, verificamos que o tratamento com sildenafil reduziu a área de secção transversa induzida pela Ang II e promoveu uma reestruturação das células endoteliais em vasos de resistência e de condutância. Parte desses efeitos estão relacionados com a redução significativa na produção de ROS ($\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{ONOO}^-/\cdot\text{OH}^-$), que se encontram aumentadas nos vasos dos animais hipertensos tratados apenas com veículo, diminuindo, portanto, o efeito de ROS sobre a artéria mesentérica e a aorta reduzindo, conseqüentemente, os efeitos deletérios da Ang II. Esses resultados corroboram com dados publicados anteriormente por nosso grupo de pesquisa em que observaram menor produção de ROS no LVM de camundongos 2R1C e em aorta de camundongos ateroscleróticos tratados com sildenafil (Dias *et al.*, 2014b; Balarini *et al.*, 2013).

Em trabalho desenvolvido, Guimarães e colaboradores (2013 e 2015) observaram que o tratamento com sildenafil promoveu redução da área de secção transversa e de deposição de colágeno em aorta de ratos 2R1C, por diminuir a expressão de TGF- β e de metaloproteinases (MMP-2), e ainda diminuiu a atividade da NADPH oxidase e da MMP-2. Além disso, os pesquisadores destacaram o efeito antioxidante do sildenafil, uma vez que diminuiu a produção de ROS. Em estudo realizado por Fahning e colaboradores (2015), observou-se que o tratamento com sildenafil em camundongos com hipertensão renovascular promoveu aumento do número de células endoteliais em artéria mesentérica, quando realizaram a marcação

com um anticorpo específico (CD31+), e também que, nas artérias de 2ª ordem, havia um maior número de células endoteliais presentes no vaso, quando visualizaram por microscopia eletrônica de varredura.

Nosso estudo demonstrou que o tratamento crônico com sildenafil foi capaz de restaurar a função endotelial e de promover alterações importantes na morfologia de vasos de resistência e de condutância na hipertensão induzida por Ang II. Esses resultados têm relevância, uma vez que ajudam a validar a utilização clínica do sildenafil como coadjuvante no tratamento de disfunções vasculares observadas em diversas doenças cardiovasculares. Entretanto, são necessários estudos clínicos capazes de avaliar os efeitos benéficos do sildenafil nas alterações morfológicas e na disfunção vascular de pacientes hipertensos.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que o tratamento crônico com sildenafil foi capaz de reduzir a PAS, a hipertrofia cardíaca e de restaurar a função endotelial de vasos de resistência e de condutância, por uma diminuição significativa do estresse oxidativo. Além disso, gerou alterações morfológicas importantes, como redução da hipertrofia vascular e uma reorganização das células endoteliais de animais hipertensos por infusão de angiotensina II.

Os benefícios cardiovasculares promovidos pelo inibidor PDE5 parecem ser devidos, pelo menos em parte, à redução dos níveis de angiotensina II e da produção de ROS, possibilitando um equilíbrio entre ROS/NO, apresentando um potente efeito antioxidante, e à promoção do equilíbrio na síntese de prostanoídes vasoconstritores e vasodilatadores e redução da ativação de receptores de TXA₂ em anéis e aorta. Com isso, podemos inferir que o tratamento reduziu a síntese de agentes vasoconstritores e aumentou a biodisponibilidade do NO, portanto, o sildenafil parece ser, de fato, uma estratégia promissora para atuar como coadjuvante no tratamento da hipertensão arterial, principalmente quando houver a ativação do sistema da angiotensina-renina, especialmente para o tratamento de pacientes com hipertensão resistente.



REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- Abegunde D. O.; Mathers C. D.; Adam T.; Ortegón M.; Strong K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet*, **2007**, 370 (9603), 1929-38.
- Arruda, R. M. P.; Peotta, V. A.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension*, **2005**, 46(4), 932–936.
- Aversa, A.; Vitale, C.; Volterrani, M.; Fabbri, A.; Spera, G.; Fini, M.; Rosano, G. M. C. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, **2008**, 25(1), 37–44.
- Avendaño, M. S.; Lucas E.; Jurado-Pueyo, M.; Martínez-Revelles, S.; Vila-Bedmar, R.; Mayor, F. Jr.; Salaices, M.; Briones, A. M.; Murga, C. Increased nitric oxide bioavailability in adult GRK2 hemizygous mice protects against angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, **2014**, 63(2), 369-75.
- Bader, M.; Ganten, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J. Mol. Med. (Berl)*, **2008**, 86(6), 615-21.
- Balarini, C. M.; Leal, M. A.; Gomes, I. B. S.; Pereira, T. M. C.; Gava, A. L.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J. of Transl. Med.*, **2013**, 11(1), 3.
- Basso, N.; Terragno, N. A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, **2001**, 1;38(6), 1246-9.
- Belova, L. A. Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry (Mosc)*, **2000**, 65(12), 1337-45.
- Berger, R.C.M.; Benetti, A.; Girardi, A.C.C.; Forechi, L.; de Oliveira, R.M.; Vassallo, P.F.; Mill, J.G. Influence of Long-Term Salt Diets on Cardiac Ca²⁺ Handling and Contractility Proteins in Hypertensive Rats. *Am. J. Hypertens.*, **2018**, 7;31(6):726-734.
- Bernardes, F. P.; Batista, A. T.; Porto, M. L.; Vasquez, E. C.; Campagnaro, B. P.; Meyrelles, S. S. Protective effect of sildenafil on the genotoxicity and cytotoxicity in apolipoprotein E-deficient mice bone marrow cells. *Lipids Health Dis.*, **2016**, 27, 15:100.
- Biancardi, V. C.; Bomfim, G. F.; Reis, W. L.; Al-Gassimi, S.; & Nunes, K. P. The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmac. Res.*, **2017**, 120, 88–96.
- Bivalacqua, T. J.; Sussan, T. E.; Gebaska, M. A.; Strong, T. D.; Berkowitz, D. E.; Biswal, S.; Champion, H. C. Sildenafil Inhibits Superoxide Formation and Prevents Endothelial Dysfunction in a Mouse Model of Secondhand Smoke Induced Erectile Dysfunction.

The Journal of Urology, **2009**, 181(2), 899–906.

Bolívar, J.J. Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. *Int. J. Hypertens.*, **2013**, 547809.

Braun-Menendez, E.; Fasciolo, J.C.; Leloir, L.F.; Munoz, J.M. La sustancia hipertensora de la sangre del rinon isquemido. *Rev. Soc. Arg. Biol.* **1939**;15:420–5.

Brink, M.; Wellen, J.; Delafontaine P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J. Clin. Invest.*, **1996**, 97(11), 2509-16.

Briones, A. M.; Rodríguez-Criado, N.; Hernanz, R.; García-Redondo, A. B.; Rodrigues-Díez, R. R.; Alonso, M. J.; Egido, J.; Ruiz-Ortega, M.; Salaices, M. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension*, **2009**, 54(1), 142-9.

Briones, A.M.; Arribas, S.M.; Salaices, M. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010 Mar;19(2):187-94

Buggy, J.; Fink G. D.; Johnson A. K.; Brody M. J. Prevention of the development of renal hypertension by anteroventral third ventricular tissue lesions. *Circ. Res.*, **1977**, 40, 110–117.

Cabassi, A.; Coghi, P.; Govoni, P.; Barouhiel, E.; Speroni, E.; Cavazzini, S.; Cantoni, A. M.; Scandroglio, R.; Fiaccadori, E. Sympathetic modulation by carvedilol and losartan reduces angiotensin II-mediated lipolysis in subcutaneous and visceral fat. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2005**, 90(5), 2888-97.

Calhoun, D.A.; Jones, D.; Textor, S.; Goff, D.C.; Murphy, T.P.; Toto, R.D.; White, A.; Cushman, W.C.; White, W.; Sica, D.; Ferdinand, K.; Giles, T.D.; Falkner, B.; Carey, R.M. American Heart Association Professional Education Committee. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. **2008**, 24;117(25):e510-26.

Campagnaro, B. P.; Gava, A. L.; Meyrelles, S. S.; & Vasquez, E. C. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. *Internat. J. of Hypert.*, **2012**, 968123.

Campagnaro, B. P.; Tonini, C. L.; Doche, L. M.; Nogueira, B. V.; Vasquez, E. C.; Meyrelles, S. S. Renovascular Hypertension Leads to DNA Damage and Apoptosis in Bone Marrow Cells. *DNA and Cell Biology*, **2013**, 32(8), 458–466.

Campagnaro, B. P.; Tonini, C. L.; Nogueira, B. V.; Casarini, D. E.; Vasquez, E. C.; Meyrelles, S. S. DNA damage and augmented oxidative stress in bone marrow mononuclear cells from angiotensin-dependent hypertensive mice. *International Journal of Hypertension*, **2013**, 305202.

Campos, R. R.; Bergamaschi, C. T. Comments on Point: Counter point: The dominant contributor to systemic hypertension: Chronic activation of the sympathetic nervous system vs. Activation of the intrarenal renin-angiotensin system. Sympathetic activation: cause or consequence of hypertension? *J. Appl. Physiol.* (1985), **2010**, 109(6), 2013-4.

Carlström, M.; Lai, E. Y.; Ma, Z.; Steege, A.; Patzak, A.; Eriksson, U. J.; Lundberg, J. O.; Wilcox C. S.; Persson, A. E. Superoxide dismutase 1 limits renal microvascular remodeling and attenuates arteriole and blood pressure responses to angiotensin II via modulation of nitric oxide bioavailability. *Hypertension*, **2010**, 56(5), 907-13.

Cassis, L. A.; English, V. L.; Bharadwaj, K.; Boustany C. M. Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology*, **2004**, 145(1), 169-74.

Cavalcanti, C. de O.; Alves, R. R.; de Oliveira, A. L.; Cruz, J. de C.; de França-Silva, M. do S.; Braga, V. de A.; Balarini, C. de M. Inhibition of PDE5 restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Front. in Phys.*, **2016**, 7, 1–9.

Chalupsky, K.; Cai, H. Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2005**, 102(25), 9056-61.

Chan, S. L.; Baumbach G. L. Deficiency of Nox2 prevents angiotensin II-induced inward remodeling in cerebral arterioles. *Front. Physiol.*, **2013**, 4, 133.

Cola, M. S.; Gava, A. L.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Endothelial dysfunction of resistance vessels in female apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids in Health and Disease*, **2010**, 9, 51.

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

Cox, B. F.; Bishop, V. S. Neural and humoral mechanisms of angiotensin-dependent hypertension. *Am. J. Physiol.*, **1991**, 261, H1284–H1291.

Crowley, S. D. The Cooperative Roles of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Antiox. & Red. Signal.*, **2014**, 20(1), 102–120.

Dal-Ros, S.; Zoll, J.; Lang, A. L., Auger, C.; Keller, N.; Bronner, C.; Geny, B. Schini-Kerth, V.B. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: role of NADPH oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2011**, 404, 743–749.

Danziger, R. S. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail Rev.*, **2008**, 13(3), 293-8.

Dayer, C.; Stamenkovic, I. Recruitment of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) to the Fibroblast Cell Surface by Lysyl Hydroxylase 3 (LH3) Triggers Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Activation and Fibroblast Differentiation. *J. Bio. Chem.*, **2015**, 290(22), 13763-78.

Almeida, L.S.; Barboza, J.R.; Freitas, F.P.S.; Porto, M.L.; Vasquez, E.C.; Meyrelles, S.S.; Gava, A.L.; Pereira, T.M.C. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **2016**, 35(11):1194-1202.

de Gasparo, M.; Catt, K. J.; Inagami, T.; Wright, J. W.; Unger, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.*, **2000**, 52(3), 415-72.

de Moraes, S.D.B.; Shanks, J.; Zucker, I.H. Integrative Physiological Aspects of Brain RAS in Hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018** Feb 26;20(2):10.

Del Borgo, M.; Wang, Y.; Bosnyak, S.; Khan, M.; Walters, P.; Spizzo, I.; Perlmutter, P.; Hilliard, L.; Denton, K.; Aguilar, M. I.; Widdop, R. E.; Jones, E. S. β -Pro7Ang III is a novel highly selective angiotensin II type 2 receptor (AT2R) agonist, which acts as a vasodepressor agent via the AT2R in conscious spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. (Lond)*, **2015**, 129(6), 505-13.

DeMarco, V.G.; Aroor, A.R.; Sowers, J.R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **2014**, 10(6):364-76.

Denninger, J. W.; Marlatta, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, **1999**, 1411: 334-50.

Devereux, R. B.; Wachtell, K.; Gerds, E.; Boman, K.; Nieminen, M. S.; Papademetriou, V.; Rokkedal, J.; Harris, K.; Aurup, P.; Dahlof, B. Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *JAMA*, **2004**, 292, 2350–2356.

Dias, A.T.; Cintra, A.S.; Frossard, J.C.; Palomino, Z.; Casarini, D.E.; Gomes, I.B.; Balarini, C.M.; Gava, A.L.; Campagnaro, B.P.; Pereira, T.M.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *J. Transl. Med.* **2014**, 16;12:250.

Dias, A.T.; Rodrigues, B.P.; Porto, M.L.; Gava, A.L.; Balarini, C.M.; Freitas, F.P.; Palomino, Z.; Casarini, D.E.; Campagnaro, B.P.; Pereira, T.M.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *J. Transl. Med.*, **2014** 6;12:35.

Didion, S. P. Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature. *Intern. J. of Mol. Sci.*, **2017**, 18(12).

Didion, S. P.; Kinzenbaw, D. A.; and Faraci, F. M. Critical role for CuZn-superoxide dismutase in preventing angiotensin II-induced endothelial dysfunction. *Hypertension*, **2005**, 46, 1147–1153.

Didion, S. P.; Kinzenbaw, D. A.; Schrader, L. I.; Chu, Y.; Faraci, F. M. Endogenous interleukin-10 inhibits angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Hypertension*, **2009**, 54, 619–624.

Droyvold, W.B.; Midthjell, K.; Nilsen, T.I.; Holmen, J. Change in body mass index and its impact on blood pressure: a prospective population study. *Int. J. Obes. (Lond)*., **2005**, 29:650–655.

Drummond, G.R.; Sobey, C.G. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.*, **2014**, 25(9):452-63.

Dudenbostel, T.; Siddiqui, M.; Gharpure, N.; Calhoun, D.A. Refractory versus resistant hypertension: Novel distinctive phenotypes. *J. Nat. Sci.*, **2017**, 3(9). pii: e430.

Ellinsworth, D.C.; Shukla, N.; Fleming, I.; Jeremy, J.Y. Interactions between thromboxane A₂, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovasc. Res.*, **2014**, 102, 9-16.

Fahning, B. M.; Dias, A. T.; Oliveira, J. P.; Gava, A. L.; Porto, M. L.; Gomes, I. B.; Meyrelles, S. S. Sildenafil improves vascular endothelial structure and function in renovascular hypertension. *Cur. Pharmac. Biotech.*, **2015**, 16(9).

Fagard, R. et al. Heritability of conventional and ambulatory blood pressures: a study in twins. *Hypertension*, **1995**, 26, 919–924.

Faria, A. P. C.; de Modolo, R.; Moreno, B. V. D.; Moreno, H. Effects of PDE type 5 inhibitors on Left Ventricular Diastolic Dysfunction in Resistant Hypertension. *Arq. Bras. de Card.*, **2014**, 85–89.

Féletou, M.; Köhler, R.; Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: Possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr. Hypertens. Rep.* **2010**, 12, 267–275.

Folkow, B. Relationship between physical vascular properties and smooth muscle function: its importance for vascular control and reactivity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **1975**, Suppl. 2,55-61.

Forouzanfar, M. H.; Liu, P.; Roth, G. A.; Ng, M.; Biryukov, S.; Marczak, L.; Murray, C. J. L. Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015. *JAMA - J. of the Amer. Med. Assoc.*, **2017**, 317(2), 165–182.

Francis, S. H.; Lincoln, T. M.; Corbin, J. D. Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. *J. of Biol. Chem.*, **1980**, vol.255, no.2, pp.620–626.

Fujii, N.; Brunt, V.E.; Minson, C.T. Tempol improves cutaneous thermal hyperemia through increasing nitric oxide bioavailability in young smokers. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **2014**, 306, H1507–H1511.

Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **1980**, 288(5789), 373-6.

Galougahi, K.K.; Liu, C.C.; Gentile, C.; Kok, C.; Nunez, A.; Garcia, A.; Fry, N.A.; Davies, M.J.; Hawkins, C.L.; Rasmussen, H.H.; Figtree, G.A. Glutathionylation mediates angiotensin ii-induced enos uncoupling, amplifying nadph oxidase-dependent endothelial dysfunction. *Jour. of the Am. Heart Assoc.*, **2014**, 3, e000731.

Gao, J.; Marc, Y.; Iturrioz, X.; Leroux, V.; Balavoine, F.; Llorens-Cortes, C. A new strategy for treating hypertension by blocking the activity of the brain renin-angiotensin system with aminopeptidase A inhibitors. *Clin. Sci. (Lond)*, **2014**, 127(3), 135-48.

Gebska, M. A.; Stevenson, B. K.; Hemnes, A. R.; Bivalacqua, T. J.; Haile, A.; Hesketh, G. G.; Champion, H. C. Phosphodiesterase-5A (PDE5A) is localized to the endothelial caveolae and modulates NOS3 activity. *Cardiov. Res.*, **2011**, 90(2), 353–363.

Global health estimates: deaths by cause, age, sex and country, 2000–2012. Geneva: World Health Organization; 2014.

Gomez-Sanchez, E. P.; Gomez-Sanchez, C. M.; Plonczynsk, M.; Gomez-Sanchez, C. E. Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rathypertension. *Exp. Physiol.*, **2010**, 95(1), 120-30.

Gomolak, J. R.; Didion, S. P. Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation. *Frontiers in Physiology*, **2014**, 5(October), 396.

Gonzalez-Vicente, A.; Saikumar, J. H.; Massey, K. J.; Hong, N. J.; Dominici, F. P.; Carretero, O. A.; Garvin, J. L. Angiotensin II stimulates superoxide production by nitric oxide synthase in thick ascending limbs. *Physiol. Rep.*, **2016**, 4(4), e12697.

González, G. E.; Rhaleb, N. E.; D'Ambrosio, M. A.; Nakagawa, P.; Liao, T. D.; Peterson, E. L.; Carretero, O. A. Cardiac-deleterious role of galectin-3 in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Amer. Jour. of Phys.-Heart and Circul. Phys.*, **2016**, 311(5), H1287–H1296.

Gromotowicz-Poplawska, A.; Stankiewicz, A.; Mikita, J.; Aleksiejczuk, M.; Marcinczyk, N.; Szemraj, J.; Chabielska, E. Beneficial effect of combined spironolactone and quinapril treatment on thrombosis and hemostasis in 2K1C hypertensive rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, **2018**, 69(2).

Gryglewski, R. J.; Palmer, R. M. J.; Moncada, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, **1986**, 320, 454–456

Guazzi, M.; Samaja, M.; Arena, R.; Vicenzi, M.; Guazzi, M. Long-term use of sildenafil in the therapeutic management of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2007, 50, 2136–2144.

Guimarães, D. A.; Rizzi, E.; Ceron, C. S.; Martins-Oliveira, A.; Gerlach, R. F.; Shiva, S.; Tanus-Santos, J. E. Atorvastatin and sildenafil decrease vascular TGF- β levels and MMP-2 activity and ameliorate arterial remodeling in a model of renovascular hypertension. *Redox Biology*, 2015, 6, 386–395.

Guimarães, D. A.; Rizzi, E.; Ceron, C. S.; Pinheiro, L. C.; Gerlach, R. F.; Tanus-Santos, J. E. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biology*, 2013, 1(1), 578–585.

Gupta-Malhotra, M.; Banker, A.; Shete, S.; Hashmi, S. S.; Tyson, J. E.; Barratt, M. S.; Hecht, J. T.; Milewicz, D. M.; Boerwinkle, E. Essential hypertension vs. secondary hypertension among children. *Am. J. Hypertens.*, 2015, 28(1), 73-80.

Guzik, T. J.; Touyz, R. M. Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension*, 2017, 70, 660–667.

Han, Y.; Runge, M. S.; Brasier, A. R. Angiotensin II induces interleukin 6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor- κ B transcription factors. *Circ. Res.*, 1999, 84, 695–703.

Handy, D.E.; Loscalzo, J. Responses to reductive stress in the cardiovascular system. *Free Radic. Biol. Med.* 2017, 109, 114–124.

Hennrikus, M.; Gonzalez, A. A.; Prieto, M. C. The prorenin receptor in the cardiovascular system and beyond. *Am. J. Physiol. Heart Circ., Physiol.* 2017, 314(2), H139-H145.

Huang, B. S.; Ahmad, M.; White, R. A.; Marc, Y.; Llorens-Cortes, C.; Leenen, F. H. Inhibition of brain angiotensin III attenuates sympathetic hyperactivity and cardiac dysfunction in rats post-myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, 2013, 97(3), 424-31.

Huber, G.; Schuster, F.; Raasch, W. Brain renin-angiotensin system in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Pharm. Res.*, 2017, 125, 72–90.

Idris Khodja, N.; Chataigneau, T.; Auger, C.; Schini-Kerth, V. B. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. *PLoS ONE*, 2012, 7, e32039.

Imanishi, T.; Kobayashi, K. Kuroi, A.; Mochizuki, S.; Goto, M.; Yoshida, K.; Akasaka, T. Effects of angiotensin II on NO bioavailability evaluated using a catheter-type NO sensor. *Hypertension.*, 2006, 48(6), 1058-65.

Intengan, H. D.; Schiffrin, E. L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*, 2000, 36(3), 312-8.

loakeimidis, N.; Kostis, J. B. Pharmacologic therapy for erectile dysfunction and its interaction with the cardiovascular system. *Jour. of Cardio. Pharm. and Therap.*, **2014**, 19(1), 53–64.

Jennings, B. L.; Anderson, L. J.; Estes, A. M.; Yaghini, F. A.; Fang, X. R.; Porter, J.; Gonzalez, F. J.; Campbell, W. B.; Malik, K. U. Cytochrome P450 1B1 contributes to renal dysfunction and damage caused by angiotensin II in mice. *Hypertension*, **2012**, 59, 348–354.

Johnson, R. F.; Beltz, T. G.; Thunhorst, R. L.; Johnson, A. K. Investigations on the physiological controls of water and saline intake in C57BL/6 mice. *Amer. Jour. of Phys. Regul. Integrative and Comparative Physiology*, **2003**, 285(2), R394-403.

Kawai, T.; Forrester, S. J.; O'Brien, S.; Baggett, A.; Rizzo, V.; Eguchi, S. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. *Pharm. Res.*, **2017**, 125, 4–13.

Khan, N. S.; Song, C. Y.; Jennings, B. L.; Estes, A. M.; Fang, X. R.; Bonventre, J. V.; Malik, K. U. Cytosolic phospholipase A2 α is critical for angiotensin II-induced hypertension and associated cardiovascular pathophysiology. *Hypertension*, **2015**, 9:04803.

Khan, N. S.; Song, C. Y.; Thirunavukkarasu, S.; Fang, X. R.; Bonventre, J. V.; Malik, K. U. Cytosolic Phospholipase A2 α Is Essential for Renal Dysfunction and End-Organ Damage Associated with Angiotensin II-Induced Hypertension. *Amer. Jour. of Hypert.*, **2016**, 29(2), 258–265.

Kiss, T.; Kovacs, K.; Komocsi, A.; Tornnyos, A.; Zalan, P.; Sumegi, B.; Kovacs, K. Novel Mechanisms of Sildenafil in Pulmonary Hypertension Involving Cytokines/Chemokines, MAP Kinases and Akt. *PLoS ONE*, **2014**, 9(8), e104890.

Kopf, P. G.; Phelps, L. E.; Schupbach, C. D.; Johnson, A. K.; Peuler, J. D. Differential effects of long-term slow-pressor and subpressor angiotensin II on contractile and relaxant reactivity of resistance versus conductance arteries. *Physiol. Rep.*, **2018**, 6(5), e13623.

Korsgaard, N.; Mulvany, M. J. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension*. **1988**, 12(2), 162-7.

Kossmann, S.; Hu, H.; Steven, S.; Schönfelder, T.; Fraccarollo, D.; Mikhed, Y.; Wenzel, P. Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by Angiotensin II. *Jour. of Biol. Chem.*, **2014**, 289(40), 27540–27550.

Koupparis, A.J.; Jeremy, J.Y.; Muzaffar, S.; Persad, R.; Shukla, N. 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 Int*. **2005**, 96(3):423-7.

Landmesser, U.; Drexler, H. Endothelial function and hypertension. *Curr. Opin. Cardiol.*, **2007**, 22(4), 316-20.

Lassègue, B.; Clempus, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2003**, 285(2), R277-97.

Lassegue, B.; Sorescu, D.; Szocs, K.; Yin, Q.; Akers, M.; Zhang, Y.; et al. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: Nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ. Res.*, **2001**, 88, 888–894.

Leal, M. A.; Balarini, C. M.; Dias, A. T.; Porto, M. L.; Gava, A. L.; Pereira, T. M. C.; Vasquez, E. C. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: The beneficial effects of sildenafil. *Curr. Pharm. Biotech.*, **2015**, 16(6).

Leal, M. A. S.; Dias, A. T.; Porto, M. L.; Brun, B. F.; Gava, A. L.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Sildenafil (Viagra®) Prevents Cox-1/ TXA2 Pathway-Mediated Vascular Hypercontractility in ApoE^{-/-}Mice. *Cel. Phys. and Bioch.*, **2017**, 44(5):1796-1809.

Leckie, B. J. Targeting the renin-angiotensin system: what's new? *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.*, **2005**, 3(1), 23-32

Lefkowitz, R. J.; Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, **2005**, 308(5721), 512-7.

Lewington, S.; Clarke, R.; Qizilbash, N.; Peto, R.; Collins, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual. *Lancet*, **2002**, 360(9349), 1903–13.

Lezama-Martínez, D.; Valencia-Hernández, I.; Flores-Monroy, J.; Martínez-Aguilar, L. Combination of β Adrenergic Receptor Block and Renin-Angiotensin System Inhibition Diminished the Angiotensin II-Induced Vasoconstriction and Increased Bradykinin-Induced Vasodilation in Hypertension. *Dose Response*. **2017**, 12;15(4):1559325817737932.

Li, B.; Yang, L.; Shen, J.; Wang, C.; Jiang, Z. The antiproliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells is mediated via upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and degradation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Anesth. Analg.*, **2007**, 105(4), 1034–41, 52.

Li, J. M.; Shah, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2004**, 287(5), R1014-30.

Li, X. C.; Zhang, J.; Zhuo, J. L. The vasoprotective axes of the renin-angiotensin system: Physiological relevance and therapeutic implications in cardiovascular, hypertensive and kidney diseases. *Pharmacol. Res.*, **2017**, 125(Pt A), 21-38.

Liang Ng, F.; Warren, H.R.; Caulfield, M.J. Hypertension genomics and cardiovascular prevention. *Ann. Transl. Med.*, **2018**, 6(15):291.

Lin, S. Y.; Liu, W. Y.; Chen, W. C.; Chen, R. H. Secondary Hypertension due to a Renin-secreting Juxtaglomerular Cell Tumor. *J. of the Form. Med. Assoc.*, **2010**, 109(3), 237–240.

Liu, Y.; You, Y.; Song, T.; Wu, S.; Liu, L. Impairment of endothelium-dependent relaxation of rat aortas by homocysteine thiolactone and attenuation by captopril. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **2007**, 50, 155–161.

Lu, J.; Shimpō, H.; Shimamoto, A.; Chong, A. J.; Hampton, C. R.; et al. Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **2004**, 128(6): 850–9.

Luo, L.; Dai, D. Z.; Cheng, Y. S.; Zhang, Q.; Yuan, W. J.; Dai, Y. Sildenafil improves diabetic vascular activity through suppressing endothelin receptor A, iNOS and NADPH oxidase which is comparable with the endothelin receptor antagonist CPU0213 in STZ-injected rats. *J. of Pharm. and Pharmac.*, **2011**, 63(7), 943–951.

Lüscher, T. F. Endothelial dysfunction: the role and impact of the renin-angiotensin system. *Heart*, **2000**, 84 Suppl 1:i20-2:50.

Luz, P.L.; Laurindo, F.R.M.; Chagas, A.C.P. Endotélio e Doenças Cardiovasculares. 1ed. São Paulo: Atheneu; 2005.

Majeed, B. A.; Ebersson, L. S.; Tawinwung, S.; Larmonier, N.; Secomb, T. W.; Larson, D. F. Functional aortic stiffness: role of CD4+ T lymphocytes. *Front. in Phys.*, **2015**, 6, 1–8.

Malachias, M. V. B. et al., 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial. *Arq. Bras. Cardiol.*, **2016**, 107(3Supl.3), 1-83.

Marathe, N.; Rangaswami, H.; Zhuang, S.; Boss, G. R.; Pilz, R. B. Pro-survival Effects of 17 β -Estradiol on Osteocytes Are Mediated by Nitric Oxide/cGMP via Differential Actions of cGMP-dependent Protein Kinases I and II. *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287(2): 978–988

Martínez-Revelles, S.; García-Redondo, A. B.; Avendaño, M. S.; Varona, S.; Palao, T.; Orriols, M.; Roque, F. R.; Fortuño, A.; Touyz, R. M.; Martínez-González, J.; Salaices, M.; Rodríguez, C.; Briones, A. M. Lysyl Oxidase Induces Vascular Oxidative Stress and Contributes to Arterial Stiffness and Abnormal Elastin Structure in Hypertension: Role of p38MAPK. *Antioxid. Redox Signal.*, **2017**, 27(7), 379-397.

McGregor, L. Histological Changes in the Renal Glomerulus in Essential(Primary) Hypertension: A Study of Fifty-One Cases. *Am. J. Pathol.*, **1930**, 6(3), 347-366.3.

Mehrotra N, Gupta M, Kovar A, Meibohm B. The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase- 5 inhibitor therapy. *Int J Impot Res.* 2007;19(3):253-264.

Meyrelles, S. S.; Peotta, V. A.; Pereira, T. M. C.; Vasquez, E. C. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: Insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease*, **2011**, 10(1), 211.

McKinsey, T. A.; Kass, D. A. Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2007**, 6:617–635.

Modolo, R.; De Faria, A. P.; Sabbatini, A. R.; Barbaro, N. R.; Ritter, A. M. V.; Moreno, H. Refractory and resistant hypertension: Characteristics and differences observed in a specialized clinic. *Journal of the American Society of Hypertension*, **2015**, 9(5), 397–402.

Mollnau, H.; Wendt, M.; Szöcs, K.; Lassègue, B.; Schulz, E.; Oelze, M.; Li, H.; Bodenschatz, M.; August, M.; Kleschyov, A. L.; Tsilimingas, N.; Walter, U.; Förstermann, U.; Meinertz, T.; Griendling, K.; Münzel, T. Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ. Res.*, **2002**, 90(4), E58-65.

Montezano, A.C.; Nguyen Dinh Cat A.; Rios, F. J.; Touyz, R. M. Angiotensin II and vascular injury. *Curr. Hypertens. Rep.*, **2014**, 16(6), 431.

Montezano, A. C.; Dulak-Lis, M.; Tsiropoulou, S.; Harvey, A.; Briones, A. M.; Touyz, R. M. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can. J. Cardiol.*, **2015**, 31(5), 631-41.

Musicki, B.; Bivalacqua, T. J.; Champion, H. C.; Burnett, A. L. Sildenafil promotes eNOS activation and inhibits NADPH oxidase in the transgenic sickle cell mouse penis. *J. Sex. Med.*, **2014**, 11(2), 424-30.

Nagayama, T.; Hsu, S.; Zhang, M.; Koitabashi, N.; Bedja, D.; Gabrielson, K.L.; Takimoto, E.; Kass, D.A. Sildenafil stops progressive chamber, cellular, and molecular remodeling and improves calcium handling and function in hearts with pre-existing advanced hypertrophy caused by pressure overload. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2009**, 53(2), 207-15.

Nagendran, J.; Archer, S. L.; Soliman, D.; Gurtu, V.; Moudgil, R.; Haromy, A.; St Aubin, C.; Webster, L.; Rebeyka, I. M.; Ross, D. B.; Light, P. E.; Dyck, J. R.; Michelakis, E. D. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type5 improves contractility. *Circulation*, **2007**, 116:238–248.

Nair, A.B; Jacob. S.; A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.*, **2016**, 7(2), 27- 31.

Nogueira, B. V.; Palomino, Z.; Porto, M. L.; Balarini, C. M.; Pereira, T. M. C.; Baldo, M. P.;Vasquez, E. C. Granulocyte colony stimulating factor prevents kidney infarction

and attenuates renovascular hypertension. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **2012**, 29(1–2).

Nogueira, B. V.; Peotta, V. A.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Evaluation of Aortic Remodeling in Apolipoprotein E-deficient Mice and Renovascular Hypertensive Mice. *Archives of Medical Research*, **2007**, 38(8), 816–821.

Oparil, S.; Acelajado, M. C.; Bakris, G. L.; Berlowitz, D. R.; Cifková, R.; Dominiczak, A. F.; Whelton, P. K. *Hypertension. Nature Reviews Disease Primers*, **2018**, 4, 18014.

Owens, A. P.; Subramanian, V.; Moorlegghen, J. J.; Guo, Z.; McNamara, C. A.; Cassis, L. A.; Daugherty, A. Angiotensin II induces a region-specific hyperplasia of the ascending aorta through regulation of inhibitor of differentiation 3. *Circ. Res.*, **2010**, 106(3), 611-9.

Page, I.H.; Helmer, O.M. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin-activator. *J. Exp. Med.*, **1940**, 71: 29–42.

Page IH. On the nature of the pressor action of renin. *J. Exp. Med.*, **1939**, 70:521– 42.

Paravicini T. M.; Touyz, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, **2008**, 31 Suppl 2, S170-80.

Paris, J. J.; Eans, S. O.; Mizrachi, E.; Reilley, K. J.; Ganno, M. L.; McLaughlin, J. P. Central administration of angiotensin IV rapidly enhances novel object recognition among mice. *Neuropharmacology*, **2013**, 70, 247–53.

Parker, S. B.; Wade, S. S.; Prewitt, R. L. Pressure mediates angiotensin II-induced arterial hypertrophy and PDGF- A expression. *Hypertension*, **1998**, 32(3), 452–458.

Patrucco, E.; Domes, K.; Sbroggio, M.; Blaich, A.; Schlossmann, J.; Desch, M.; Hofmann, F. Roles of cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) and PDE5 in the regulation of Ang II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2014**, 111(35), 12925–12929.

Perampaladas, K.; Gori, T.; Parker, J. D. Rosiglitazone causes endothelial dysfunction in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **2012**, 17, 260–265.

Pereira, T. M. C.; Pimenta, F. S.; Porto, M. L.; Baldo, M. P.; Campagnaro, B. P.; Gava, A. L.; Vasquez, E. C. Coadjuvants in the diabetic complications: Nutraceuticals and drugs with pleiotropic effects. *Internat. J. of Mol. Sci.*, **2016**, 17(8).

Potthoff, S. A.; Stamer, S.; Grave, K.; Königshausen, E.; Sivritas, S. H.; Thieme, M.; Stegbauer, J. Chronic p38 mitogen-activated protein kinase inhibition improves vascular function and remodeling in angiotensin II-dependent hypertension. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, **2016**, 17(3).

Potthoff, S. A.; Fählng, M.; Clasen, T.; Mende, S.; Ishak, B.; Suvorava, T.; Stamer, S.; Thieme, M.; Sivritas, S. H. Kojda, G.; Patzak, A.; Rump, L. C.; Stegbauer, J. Angiotensin-(1-7) modulates renal vascular resistance through inhibition of p38

mitogen-activated protein kinase in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*, **2014**, 63(2), 265-72.

Prasad, A.; Tupas-Habib, T.; Schenke, W. H.; Mincemoyer, R.; Panza, J. A.; Waclawin, M. A.; Ellahham, S.; Quyyumi, A. A. Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, **2000**, 101(20), 2349-54.

Prasad, A. M.; Ketsawatsomkron, P.; Nuno, D. W.; Koval, O. M.; Dibbern, M. E.; Venema, A. N.; Grumbach, I. M. Role of CaMKII in Ang-II-dependent small artery remodeling. *Vascular Pharmacology*, **2016**, 87(1), 172–179.

Rajagoplan, S.; Kurz, S.; Munzel, T.; Tarpey, M.; Freeman, B. A.; Griendling, K. K.; et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. *J. Clin. Invest.*, **1996**, 97, 1916–1923.

Ramchandran, R.; Takezako, T.; Saad, Y.; Stull, L.; Fink, B.; Yamada, H.; Dikalov, S.; Harrison, D. G.; Moravec, C.; Karnik, S. S. Angiotensinergic stimulation of vascular endothelium in mice causes hypotension, bradycardia, and attenuated angiotensin response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2006**, 103(50), 19087-92.

Rapsomaniki, E.; Timmis, A.; George, J.; Pujades-Rodriguez, M.; Shah, A. D.; Denaxas, S.; Hemingway, H. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: Lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *The Lancet*, **2014**, 383(9932), 1899–1911.

Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.*, **2008**, 22(3), 659-61.

Rimoldi SF, Scherrer U, Messerli FH. Secondary arterial hypertension: when, who, and how to screen? *Eur. Heart J.* **2014**, 14;35(19):1245-54.

Rodrigues, B. P.; Campagnaro, B. P.; Balarini, C. M.; Pereira, T. M. C.; Meyrelles, S. S.; Vasquez, E. C. Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease*, **2013**, 12(1), 1.

Rosano, G.M.C.; Tamargo, J.; Kjeldsen, K.P.; Lainscak, M.; Agewall, S.; Anker, S.D.; Ceconi, C.; Coats, A.J.S.; Drexel, H.; Filippatos, G.; Kaski, J.C.; Lund, L.; Niessner, A.; Ponikowski, P.; Savarese, G.; Schmidt, T.A.; Seferovic, P.; Wassmann, S.; Walther, T.; Lewis, B.S. Expert consensus document on the management of hyperkalaemia in patients with cardiovascular disease treated with renin angiotensin aldosterone system inhibitors: coordinated by the Working Group on Cardiovascular Pharmacotherapy of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Pharmacother.*, **2018**, 1;4(3):180-188.

Rosen, R.C.; Kostis, J.B. Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **2003**, 92(9A):9M-18M.

Rubanyi, G.M.; Vanhoutte, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). *Am. J. Physiol.*, **1986**, 250, H822–H827.

Sáenz de Tejada I. Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility. *Int J Impot Res.* 2002; 14(suppl 1):S6-S10.

Sagar, S.; Kallo, I. J.; Kaul, N.; Ganguly, N. K.; Sharma, B. K. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell. Biochem.* **1992**, 111(1-2), 103-8.

Sandip, C.; Yangchen, S.L.; Amir, S.; Rezza, J.K.S.; Hisatomi, A. Effects of Long- and Intermediate-Acting Dihydropyridine Calcium Channel Blockers in Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis of 18 Prospective, Randomized, Actively Controlled Trials. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, **2018**, 1:1074248418771341.

Santa Catharina, A.; Modolo, R.; Ritter, A.M.; Quinaglia, T.; de Amorim, R.F.; Moreno, H.; de Faria A.P.; Acute sildenafil use reduces 24-Hour blood pressure levels in patients with resistant hypertension: A placebo-controlled, crossover trial. *J. Clin Hypertens (Greenwich)*. **2016**, 18(11), 1168-1172.

Santos, R.A.S.; Sampaio, W.O.; Alzamora, A.C.; Motta-Santos, D.; Alenina, N.; Bader, M.; Campagnole-Santos, M.J. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol. Rev.*, **2018**, 1;98(1):505-553.

Santos, R. A.; Ferreira, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **2007**, 16(2), 122-8.

Saura, M.; Marquez, S.; Reventun, P.; Olea-Herrero, N.; Arenas, M. I.; Moreno-Gómez-Toledano, R.; Bosch, R. J. Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS. *FASEB Journal*, **2014**, 28(11), 4719–4728.

Saura, M.; Zaragoza, C.; Bao, C.; Herranz, B.; Rodriguez-Puyol, M.; Lowenstein, C. J. Stat3 mediates interleukin-6 inhibition of human endothelial nitric-oxide synthase expression. *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281, 30057–30062.

Savoia, C.; Burger, D.; Nishigaki, N.; Montezano, A. Touyz, R. M. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert. Rev. Mol. Med.*, **2011**, 13, e11.

Scala, L. C.; Magalhães, L. B; Machado, A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. In: Moreira SM, Paola AV; Sociedade Brasileira de Cardiologia. Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2ª. ed. São Paulo: Manole, **2015**, p. 780-5.

Schrader, L. I.; Kinzenbaw, D. A.; Johnson, A. W.; Faraci, F. M.; Didion, S. P. IL-6 deficiency protects against angiotensin II-induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2007**, 27, 2576–2581.

Schwartz, B. G.; Levine, L. A.; Comstock, G.; Stecher, V. J.; Kloner, R. A. Cardiac uses of phosphodiesterase-5 inhibitors. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2012**, 59, 9–15.

Severs, W. B.; Daniels-Severs, A. E. Effects of angiotensin on the central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 1973, 25, 415–449.

Sheng, Y.; Zhu, L. The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, **2018**, 10(1):17-28.

Siedlinski, M.; Nosalski, R.; Szczepaniak, P.; Ludwig-Gałęzowska, A. H.; Mikołajczyk, T.; Filip, M.; Guzik, T. J. Vascular transcriptome profiling identifies Sphingosine kinase 1 as a modulator of angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Scientific Reports*, **2017**, 7, 1–13.

Skrbic, R.; Igic, R. Seven decades of angiotensin (1939-2009). *Peptides*, **2009**, 30(10):1945-50.

Stegbauer, J.; Friedrich, S.; Potthoff, S. A.; Broekmans, K.; Cortese-Krott, M. M.; Quack, I.; Mergia, E. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. *PLoS One*, **2013**, 8(11), e80674.

Streeten, D.H.; Anderson, G.H. Jr.; Wagner, S. Effect of age on response of secondary hypertension to specific treatment. *Am. J. Hypertens.* **1990**;3:360–365.

Suo, Y.; Zhang, Z.; Fu, H.; Zhang, Y.; Yuan, M.; Wang, Y.; Goudis, C.A.; Tse, G.; Liu, T.; Li, G. Inhibition of renin-angiotensin axis reduces the risk of thrombus formation in the left atrial appendage in patients with hypertension complicated by atrial fibrillation. *J. Renin Angiot. Aldost. Syst.*, **2018**, 19(2):1470320318782623.

Tang, E. H.; Vanhoutte, P. M. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol. Ther.*, **2009**, 122(2), 140-9.

Tang, E.H.; Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers Arch.* **2010**, 459(6):995-1004.

Thieme, M.; Sivritas, S. H.; Mergia, E. Potthoff, S. A.; Yang, G.; Hering, L.; Stegbauer, J. Phosphodiesterase 5 inhibition ameliorates angiotensin II-dependent hypertension and renal vascular dysfunction. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, **2017**, 312, F474–F481.

Thomas, A. C.; Newby, A. C. Effect of matrix metalloproteinase-9 knockout on vein graft remodelling in mice. *J. Vasc. Res.*, **2009**, 47(4), 299-308.

Torricelli, F. C. M.; Marchini, G. S.; Colombo Junior, J. R.; Coelho, R. F.; Nahas, W. C.; Srougi, M. Nephron-sparing surgery for treatment of reninoma: a rare renin secreting tumor causing secondary hypertension. *Int. Braz. J. Urol.*, **2015**, 41(1), 172–176.

Touyz, R. M.; Chen, X.; Tabet, F.; Yao, G.; He, G.; Quinn, M. T.; et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NADPH oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ. Res.* **2002**, 90, 1205–1213.

Touyz, R. M. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid. Redox Signal.*, 2005, 7(9-10), 1302-14.

Touyz, R. M. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp. Physiol.*, 2005, 90(4), 449-55.

Van Epps, H.L. Harry Goldblatt and the discovery of renin. *J. Exp. Med.*, 2005, 201(9):1351.

Vanhoutte, P.M.; Zhao, Y.; Xu, A.; Leung, S.W. Thirty years of saying NO: Sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator. *Circ. Res.*, 2016, 119, 375–396.

Vanhoutte, P. M.; Shimokawa, H.; Feletou, M.; Tang, E. H. C. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, 2017, 219(1), 22–96.

Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ. J.*, 2009, 73, 595–601.

Vasquez, E. C.; Gava, A. L.; Graceli, J. B.; Balarini, C. M.; Campagnaro, B. P.; Pereira, T. M. C.; Meyrelles, S. S. Novel Therapeutic Targets for Phosphodiesterase 5 Inhibitors: current state-of-the-art on systemic arterial hypertension and atherosclerosis. *Cur. Pharm. Biotech.*, 2016, 17(4), 347–364.

Virdis, A.; Ghiadoni, L.; Qasem, A. A.; Lorenzini, G.; Duranti, E.; Cartoni, G. Bruno, R. M.; Bernini, G.; Taddei, S. Effect of aliskiren treatment on endotheliumdependent vasodilation and aortic stiffness in essential hypertensive patients. *Eur. Heart J.*, 2012, 33, 1530–1538.

Vukelic, S.; Griendling, K. K. Angiotensin II, from vasoconstrictor to growth factor: a paradigm shift. *Circ. Res.*, 2014, 114(5), 754-7.

Wachtell, K.; Okin, P. M.; Olsen, M. H.; Dahlof, B.; Devereux, R. B.; Ibsen, H.; Kjeldsen, S. E.; Lindholm, L. H.; Nieminen, M. S.; Thygesen, K. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive therapy and reduction in sudden cardiac death: the LIFE Study. *Circulation*, 2007, 116:700–705.

Walker, A. E.; Kaplon, R. E.; Lucking, S. M.; Russell-Nowlan, M. J.; Eckel, R. H.; Seals, D. R. Fenofibrate improves vascular endothelial function by reducing oxidative stress while increasing endothelial nitric oxide synthase in healthy normolipidemic older adults. *Hypertension*, 2012, 60, 1517–1523.

Wassmann, S.; Stumpf, M.; Strehlow, K.; Schmid, A.; Schieffer, B.; Böhm, M.; et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ. Res.*, 2004, 94, 534–541.

Westermann, D.; Becher, P. M.; Lindner, D.; Savvatis, K.; Xia, Y.; Fröhlich, M.; Tschöpe, C. Selective PDE5A inhibition with sildenafil rescues left ventricular

dysfunction, inflammatory immune response and cardiac remodeling in angiotensin II-induced heart failure in vivo. *Bas. Res. in Card.*, **2012**, 107(6), 1–12.

World Health Organization. A global brief on Hypertension - World Health Day 2013. *World Health Organization*, **2013**, 1–40.

World Health Organization. Hearts: Technical package for cardiovascular disease management in primary health care. **2016**, 76.

Wray, D. W.; Nishiyama, S. K.; Harris, R. A.; Zhao, J.; McDaniel, J.; Fjeldstad, A. S.; Witman, M. A.; Ives, S. J.; BarrettO'Keefe, Z.; Richardson, R. S. Acute reversal of endothelial dysfunction in the elderly after antioxidant consumption. *Hypertension*, **2012**, 59, 818–824.

Xiao, L.; Liu, Y.; Wang, N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **2014**, 306(3), H317-25

Xu, P.; Sriramula, S.; Lazartigues, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2011**, 300(4), R804-17.

Xu, S.; He, Y.; Vokurkova, M.; Touyz, R. M. Endothelial cells negatively modulate reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells: role of thioredoxin. *Hypertension*, **2009**, 54(2), 427-33.

Yan, C.; Kim, D.; Aizawa, T.; Berk, B. C. Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2003**, 23(1), 26-36.

Zheng, J.J.; Lyu, Y.; Li, R.F.; Tian, F.J.; Mu, J.B. Interaction of heat shock protein 70 (HSP70) polymorphisms and occupational hazards increases the risk of hypertension in coke oven workers. *Occup. Environ. Med.*, **2018** Sep 14

Zimmerman, D.; Burns, K. D. Angiotensin-(1-7) in kidney disease: a review of the controversies. *Clin. Sci. (Lond)*, **2012**, 123(6), 333-46.