

2.07.99 – Fisiologia

INIBIÇÃO CRÔNICA DA FOSFODIESTERASE 5 EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS: PARÂMETROS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS VASCULARES

Teixeira-Silva JJ^{1*}, Serafim BDV², Moreira HS³, Lima-Leal GA³, Alves-Santos TR⁴, Xavier FE⁵, Silva CO⁶, Naro F⁷, Duarte GP⁸

1. Mestre, doutorando em Bioquímica e Fisiologia – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil /doutorando em Morfogenese e Engenharia de Tecidos, co-tutela Università di Roma “La Sapienza”, Itália. Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, LFFCV – UFPE.
2. Graduada em Biomedicina, LFFCV – UFPE.
3. Mestre, doutoranda em Bioquímica e Fisiologia. Laboratório de Reatividade Vascular – LRV – UFPE.
4. Doutora em Bioquímica e Fisiologia – LFFCV – UFPE.
5. Doutor em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo, LRV – UFPE.
6. Doutora em Sciences Chimiques & Biologie pour la Santé - Université de Montpellier I. LFFCV – UFPE.
7. Doutor em Embriologia Medica – Università di Roma “Tor Vergata”. Laboratorio Meccanismi Regolativi della Morfogenesi Normale e Patologica e Locomotor – Universidade de Roma “La Sapienza”, orientador em cotutela – Itália.
8. Doutora em Sciences Pharmaceutiques – Université Grenoble I. LFFCV – UFPE, orientador– Brasil.

Resumo:

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do tratamento crônico do sildenafil (SILD), um inibidor específico da fosfodiesterase 5 (PDE5), sobre parâmetros funcionais e estruturais vasculares de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), aos 3 meses de idade. Para isto, os animais foram tratados diariamente com SILD (45 mg/kg, via oral) durante 60 dias a partir de 4 semanas de idade. A inibição crônica da PDE5 preveniu o estabelecimento da disfunção endotelial em vasos de condutância. Entretanto, não foi capaz de modular parâmetros relacionados à função vascular e a estrutura dos vasos de resistência, nem o estabelecimento de hipertensão arterial.

Autorização legal:

Cômite de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Universidade Federal de Pernambuco (protocolo nº 0046/2016).

Palavras-chave:

Hipertensão; óxido nítrico; endotélio.

Apoio financeiro:

(Processo Nº 88881.068093 / 2014-01 EDICT MEC / MCTI / CAPES / CNPQ / FAPS Nº 09/2014, Ciências Sem Fronteiras, Pesquisador Visitante Especial).
EDITAL FACEPE 16/2012 APQ -1133-2.07/12

Introdução:

Nos últimos anos, os componentes da via de sinalização da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), são descritos na literatura como possíveis alvos terapêuticos no tratamento das doenças cardiovasculares (1,2). Os níveis intracelulares de GMPc, bem como os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), são modulados pela ação de diversas fosfodiesterases (PDEs), um complexo de isoenzimas categorizadas em 11 famílias, responsáveis pela hidrólise destes segundos mensageiros intracelulares, em suas formas inativas, 5'GMP e 5'AMP (3,4).

A utilização de inibidores seletivos da fosfodiesterase 5 (iPDE5), enzima responsável pela degradação seletiva de GMPc, induz aumento da intensidade e duração da resposta deste mensageiro intracelular (3). Em nível vascular, o aumento intracelular de GMPc está associado a uma maior ativação da proteína quinase dependente de GMPc – (PKG), redução dos níveis intracelulares de cálcio (Ca²⁺) e maior relaxamento do músculo liso vascular (MLV) (5-7). Nesse contexto, os iPDE5, cujos principais representantes são o SILD, o tadalafil, o vardenafil e o avanafil, constituem um alvo farmacológico em potencial para o tratamento das complicações cardiovasculares. Estes inibidores diferem entre si em relação ao tempo de meia-vida, absorção e potência farmacológica (1,8).

Recentemente nosso grupo, ao estudar o papel dos inibidores das PDEs na função vascular de ratos com 18 meses de idade, tratados cronicamente com o cilostazol, um inibidor seletivo da PDE3, demonstrou que a inibição farmacológica desta PDE, foi capaz de reverter a disfunção endotelial, caracterizado por um maior relaxamento vascular dependente do endotélio, o que foi atribuído a redução do estresse oxidativo (EO) tecidual

e a maior biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e do fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF) (9). Salienta-se que o aumento da atividade de PDEs hidrolisando GMPc tem sido associado à disfunção vascular e hipertensão arterial (10,11).

Mediante as controvérsias e escassez de dados na literatura sobre o uso de iPDE5, em modelos de hipertensão essencial, neste estudo foi investigado se o tratamento crônico com o SILD alteraria os níveis pressóricos, a função e estrutura vascular, bem como parâmetros estruturais de vasos de resistência.

Metodologia:

Animais experimentais

Foram utilizados ratos, machos, jovens (100-300g), fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), mantidos em racks com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade controlada (12 horas claro-escuro), com livre acesso a água e ração *ad libitum*.

Obtenção do modelo experimental

Os animais da linhagem SHR (n: 8-10) foram separados em dois grupos experimentais: i) Grupo SHR+v, animais que receberam apenas o veículo (NaCl, 0,9%); ii) Grupo SHR+SILD, animais que receberam diariamente SILD (45 mg/kg, via oral) durante 60 dias. O tratamento foi iniciado na quarta semana de vida dos animais, momento no qual as alterações estruturais e funcionais que resultam no aumento dos níveis pressóricos neste modelo encontravam-se ausentes.

Medida direta da pressão arterial

Ao final do protocolo experimental, os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio (50 mg/kg, via intraperitoneal) e um catéter de polietileno, heparinizado, foi introduzido na artéria femoral esquerda até o nível da aorta abdominal e, em seguida, exteriorizado em nível da nuca. Após recuperação cirúrgica (24 horas), o catéter foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados (Power Lab – ADInstruments), para aferição da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e da frequência cardíaca (FC). A pressão arterial média (PAM) foi calculada através da seguinte equação: $PAM = PAD + [(PAS - PAD)/3]$.

Avaliação da função vascular

A função endotelial foi analisada em vasos de condutância e resistência conforme descrito anteriormente na literatura (12-15). A análise do relaxamento vascular foi mensurada pela construção de curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh) e a resposta contrátil foi avaliada através das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Phe) ou noradrenalina (NORA).

Artéria pressurizada

Para análise das propriedades estruturais de vasos de resistência, o terceiro ramo do leito mesentérico foi estudado pela técnica de artérias pressurizadas, de acordo com o método proposto inicialmente por Halpern e colaboradores (16).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão da média (e.p.m). O teste t de Student pareado e/ou não-pareado foi utilizado. Para análise de bloco foi utilizada a análise de variância (ANOVA) a uma e/ou duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão:

A via de sinalização do NO/GMPc/PKG regulando o tônus vascular é descrita na literatura (7). Prejuízos em qualquer dos componentes desta via de sinalização estão associados à disfunção vascular e hipertensão (10,17). Ademais, o aumento da atividade de PDEs, em especial a PDE5, hidrolisando GMPc, tem sido relacionada à disfunção endotelial em modelos de hipertensão arterial (11,18-20).

Neste estudo, o tratamento crônico com SILD não preveniu o estabelecimento da hipertensão arterial em nosso modelo experimental. Foi observado que a inibição crônica da PDE5, preveniu o estabelecimento da disfunção endotelial aos 3 meses de idade, caracterizado por um maior relaxamento vascular à ACh, um agonista colinérgico, (grupo SHR+SILD, 80% vs. grupo SHR, 40%, $p < 0,001$) e uma menor hiperreatividade à Phe (grupo SHR+SILD, 40% vs. grupo SHR, 100%, $p < 0,001$). Por outro lado, em vasos de resistência, o tratamento crônico com o SILD não modulou a resposta vascular dependente do endotélio à ACh e NORA, nos animais do grupo SHR+SILD, quando comparado aos animais do grupo controle.

Os parâmetros morfológicos do terceiro ramo da artéria mesentérica de resistência foram determinados através da análise dos diâmetros do vaso, diâmetro do lúmen, da espessura da parede, da relação espessura da parede/lúmen do vaso, bem como da análise da área de secção transversa. Para análise das propriedades passivas do vaso, os protocolos foram realizados na ausência de Ca^{2+} . O tratamento crônico com SILD, não foi capaz de prevenir a instalação das alterações estruturais/geométricas (remodelamento vascular), clássicas neste

modelo experimental.

Conclusões:

O tratamento crônico com SILD, preveniu o estabelecimento da disfunção endotelial em vasos de condutância. Dados preliminares sugerem que a redução do estresse oxidativo tecidual pode estar relacionado a estes achados (dados não mostrados). Por outro lado, a inibição crônica da PDE5, não preveniu a instalação das alterações funcionais e estruturais em vasos de resistência aos 3 meses de idade. Nesse sentido, esforços estão sendo realizados a fim de compreender quais os mecanismos relacionados ao papel da PDE5 na via do NO/GMPc/PKG. Esta compreensão poderá ser útil para traçar novas estratégias no controle dos níveis pressóricos.

Referências bibliográficas

1. Lukowski R., et al. (2014) Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: boom, bust and beyond. **Trends Pharmacol Sci.**, 35(8).
2. Das A., et al (2015) PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. **Pharmacol Ther.**, 147:12-21.
3. Zaccolo M., et al. (2007) cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. **Cir Res.**, 100(1):1569-1578.
4. Beavo JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiol Rev.**, 75:725–748.
5. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP (2000). Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **J Cell Physiol.**, 184(3):409-420.
6. Koller A, Huang A (1994). Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. **Circ Res.**, 74: 416-421.
7. Charlotte F, Lauriane YMM and Jean-Luc (2018). Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nat Rev Cardiol.**, 1-25.
8. Frey MK, Landg I (2012). Tadalafil for the treatment of pulmonary hypertension. **Expert Opin Pharmacother**, (13)747-755.
9. Moreira HS, Lima-Leal GA, Santos-Rocha J, Gomes-Pereira L, Duarte GP, Xavier FE (2018). Phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol reverses endothelial dysfunction with ageing in rat mesenteric resistance arteries. **Eur J Pharmacol.**, 5(822):59-68.
10. Mergia E., et al. (2016) Role of Phosphodiesterase 5 and Cyclic GMP in Hypertension. **Cur Hypertens Rep.**, 18:39.
11. Stegbauer J., et al. (2013) Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. **PLoS One.**, 8(11):e80679.
12. Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE (2012). Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. **Br J Pharmacol.**, 166(7):2198-208.
13. Queiroz DB., et al. (2017) Losartan reverses COX-2-dependent vascular dysfunction in offspring of hyperglycaemic rats. **Life Sci.**, 1;184:71-80.
14. Sá FG, et al. (2017) Hyperglycaemia in pregnant rats causes sex-related vascular dysfunction in adult offspring: role of cyclooxygenase-2. **Exp Physiol.**, 102(8):1019-1036.
15. Mulvany MJ, et al. (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive rats. **Circ Res.**, 41:19-26.
16. Halpern W, Mulvany MJ, Warshaw DM (1978). Mechanical properties of smooth muscle cells in the walls of resistance arteries. **J Physiol.**, 275:85-101.
17. Groneberg D, König P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D, Friebe A (2010). Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. **Circulation.**, 121(3):401–409.
18. Cavalcanti CO, Alves RR, de Oliveira AL, Cruz JC, de Franca Silva MS, Braga VA, et al (2016). Inhibition of PDE5 restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Front Physiol.**, 7:15.
19. Dias AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, et al (2014). Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **J Transl Med.**, 12:35.
20. Yaguas K., et al. (2010) Chronic Sildenafil Treatment Corrects Endothelial Dysfunction and Improves Hypertension. **Am J Nephrol.**, 31:283–291.