



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

YEIMER ANTONIO SANTIAGO GUEVARA

**SILDENAFIL NÃO ALTERA A RESPOSTA BARORREFLEXA NEM A VIA
DE SINALIZAÇÃO DO CÁLCIO EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

RECIFE

2021

YEIMER ANTONIO SANTIAGO GUEVARA

**SILDENAFIL NÃO ALTERA A RESPOSTA BARORREFLEXA NEM A VIA
DE SINALIZAÇÃO DO CÁLCIO EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Profa. Dra. Glória Isolina B. Pinto Duarte

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Guevara, Yemer Antonio santiago

Sildenafil não altera a resposta barorreflexa nem a via de sinalização do cálcio em ratos espontaneamente hipertensos / Yemer Antonio Santiago Guevara. – 2021.

108 f. : il.

Orientadora Profa. Dra. Glória Isolina B. Pinto Duarte .

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2021. Inclui referências e apêndices.

1. Hipertensão. 2. Medicamentos. 3. agentes cardiovasculares. I. Duarte, Glória Isolina B. Pinto (orientadora). II. Título.

616.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-112

YEIMER ANTONIO SANTIAGO GUEVARA

**SILDENAFIL NÃO ALTERA A RESPOSTA BARORREFLEXA NEM A VIA
DE SINALIZAÇÃO DO CÁLCIO EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Gloria Isolina B. Pinto Duarte

Aprovado por: 31/agosto/2021

Dra. Valéria Nunes de Souza

(Examinador interno, presidenta)

Dr. Eduardo Carvalho Lira

(Examinador interno)

Dra. Cristina Oliveira Silva

(Examinador externo)

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte, por todo o conhecimento, dedicação e paciência em meu processo de aprendizagem e formação de mestrado.

Aos professores que fazem parte do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Departamento de Bioquímica, por sua contribuição para minha formação acadêmica.

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, pela sua colaboração constante.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Aos órgãos de fomento: CAPES/PROGRAMA CIÊNCIA SEM FRONTEIRAS (Proc. nº 88881.068093/2014-0), Edital FACEPE 16/2012, Multiusuário. Processo:1133-2.07/2012pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O Sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase 5a (PDE5a) amplamente utilizado no tratamento da disfunção erétil e hipertensão pulmonar, tem demonstrado efeito cardioprotetor através da modulação da resposta miocárdica durante a estimulação simpática crônica, melhorando a função endotelial. Com base nesses achados, é sugerido que o Sildenafil possa modular as proteínas envolvidas na regulação do cálcio no cardiomiócito e a resposta barorreflexa em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Portanto, nosso objetivo foi avaliar o efeito do tratamento crônico com Sildenafil na resposta barorreflexa e na via cardíaca do cálcio em SHR. Para isso, 22 ratos machos de 4 meses de idade foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo recebeu Sildenafil (45mg/kg, via oral) por 60 dias e o segundo grupo recebeu salina durante o mesmo período. No final do tratamento, a pressão arterial (PA) foi aferida por pletismografia de cauda. Em seguida, os animais foram submetidos a cirurgia (para inserção de cateter na artéria e veia femoral) para o registro de parâmetros cardiovasculares e avaliação da resposta barorreflexa. Um subgrupo de animais controles e tratados foram eutanasiados e o tecido cardíaco coletado para análise proteica por Western blot. Em ratos não anestesiados, a pressão arterial média ($156,0 \pm 4,74$ mmHg controle vs. $148,2 \pm 5,92$ mmHg Sildenafil) foi similar no grupo tratado ou não com Sildenafil. Também, não houve alteração da sensibilidade reflexa e expressão proteica de CASQ2, pTnI, NXC, SERCA2a e pCaMKII. Nossos resultados sugerem que o uso crônico de Sildenafil em SHRs não reduz a pressão arterial, não melhora a sensibilidade barorreflexa nem modula a expressão de proteínas reguladoras do cálcio cardíaco.

Palavras chave: Cardioprotetor; Barorreflexo; SHR, Sildenafil; Fosfodiesterase 5a; Pressão arterial.

ABSTRACT

Sildenafil, a phosphodiesterase 5a (PDE5a) inhibitor used for the treatment of erectile dysfunction and pulmonary hypertension, has shown a cardioprotective effect by modulating the myocardial response during chronic sympathetic stimulation and improving endothelial function. Based on these findings, it is suggested that Sildenafil can modulate the proteins involved in the regulation of calcium in the cardiomyocyte and the baroreflex response in an in vivo spontaneously hypertensive rat (SHR) model. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of chronic treatment with Sildenafil on the baroreflex response and on the cardiac calcium pathway in SHR. For this, 22 4-month-old male rats were divided into two groups, the treated and the control. The first group received Sildenafil at a dose of 45mg/kg orally for 60 days, and the second group received only physiological saline solution. At the end of treatment, blood pressure was measured by tail plethysmography, and catheters were placed in the femoral artery and vein, to record cardiovascular parameters and assess the baroreflex response. Additionally, a subgroup of control and treated animals were euthanized for cardiac tissue collection and subsequent protein analysis by Western blot. In non-anesthetized rats, mean arterial pressure showed no significant difference between the group treated with Sildenafil and the control (156.0 ± 4.74 mmHg control vs. 148.2 ± 5.92 mmHg Sildenafil), and no alteration in the reflex sensitivity and protein expression of CASQ2, pTnI, NXC, SERCA2a and pCaMKII was detected. The results of this study suggest that the chronic use of Sildenafil in SHR rats does not reduce blood pressure, does not improve baroreflex sensitivity, and does not modulate the expression of cardiac calcium regulatory proteins.

Keywords: Cardioprotective; Baroreflex; SHR; Sildenafil; Phosphodiesterase 5a; Blood pressure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- O barorreflexo arterial, organização funcional.....	21
Figura 2- Mecanismos responsáveis pelo comprometimento da função do barorreceptor arterial na ICC	23
Figura 3- A conexão receptora β 1-adrenérgico / cálcio	28
Figura 4- Via de sinalização pró-hipertrófica Ca^{2+} - calcineurina – NFAT e controle inibitório em múltiplos níveis.....	33
Figura 5- Desenho experimental (a). Subgrupo de animais tratados para registro de parâmetros cardiovasculares y avaliação barorreflexa.....	41
Figura 6- Desenho experimental (b). Subgrupo de animais tratados para animais proteico por Western blot	46
Figura 7- Efeito do Sildenafil (SILD) sobre a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM).	49
Figura 8- Efeito do Sildenafil (SILD) sobre os valores de frequência cardíaca basal (FC) e frequência cardíaca intrínseca (FCI).	50
Figura 9- Efeito do Sildenafil (SILD) na resposta barorreflexa frente a fenilefrina (FEN) e nitroprussiato de sódio (NPS).....	51
Figura 10- Efeito do Sildenafil na pressão arterial media e na frequência cardíaca diante da administração de doses crescentes de fenilefrina e nitroprussiato sódico	52

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1- Procedimento para o registro da pressão arterial não invasiva.	42
Imagem 2- Procedimento para o registro da pressão arterial invasiva.....	43
Imagem 3 - Traçados representativos do comportamento da PAS e da FC ao desafio com os fármacos.	45

LISTA DE TABELAS

Tabla 1- Comparação dos parâmetros cardiovasculares e avaliação autonômica de ratos tratados com Sildenafil (SILD) e tratados com veículo (CONTROLE).....	48
Tabla 2- Comparação da expressão por Westerns blot., das proteínas cardíacas reguladoras do Ca ²⁺ de ratos tratados com Sildenafil (SILD) e tratados com veículo (CONTROLE).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AVC: Acidente cerebrovascular

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

ANG II: Angiotensina II

AT1R: Receptor do tipo 1 para Ang II

BCL-2: Proteína do linfoma de células B2

Ca²⁺: Cálcio

CaM: Calmodulina

CAMK II: Proteína quinase dependente de calmodulina II

pCAMK II: Forma fosforilada da proteína quinase dependente de calmodulina II

CASQ2: Calsequestrina 2

COX-1: Cicloxigenase 1

COX-2: Cicloxigenase 2

DCV: Doença cardiovascular

eNOS: Óxido nítrico síntase endotelial

ERK1: Quinase reguladas por sinal extracelular

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

GC: Guanil-ciclase

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

GSK-3β: Glicogênio sintase quinase 3β

HA: Hipertensão arterial

HAP: Hipertensão arterial pulmonar

HDAC 5: Histona desacetilase 5

IC: Insuficiência cardíaca

ICC: insuficiência cardíaca congestiva

IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina 1

K⁺: Potássio

LIMK1: LIM quinase-1

L-NAME: L-NG-Nitro arginina metil- éster: um inibidor da eNOS.

MAPK: proteína-quinases ativadas por mitógenos

MEF-2: Fator Potenciador de Miócitos 2

MitoKATP: Canais de potássio mitocondriais sensíveis ao trifosfato de adenosina

Na⁺: Sódio

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

Nav: canal de sódio controlado por voltagem

NCX-1: Trocador de sódio e cálcio do sarcolema

NFAT: Fator nuclear de células T ativadas

NO: Óxido nítrico

NXC1: Trocador de sódio e cálcio mitocondrial

PA: Pressão arterial

PDE5a: Fosfodiesterase 5a

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinase

PKB: Proteína quinase B

PKG: Proteína quinase G

PLB: Fosfolambano

pTnl: Troponina I fosforilada

RS: Retículo sarcoplasmático

RVP: Resistência vascular periférica

RYR2: Receptor rianodina 2

SERCA2a: Retículo sarcoplasmático Ca⁺⁺-ATPase

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SRAA: Sistema renina angiotensina aldosterona

TAC: Construção aórtica transversa

TGF-β: Fator de crescimento transformador beta

Tipo-L Ca²⁺ :Canais para cálcio tipo-L

Tnl: Subunidade inibitória da troponina

WKY: Ratos normotensos Wistar Kyoto

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA... ..	17
2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	17
2.1.1 Regulação da pressão arterial.....	19
2.1.2 Mecanismo barorreflexo e regulação da pressão arterial.....	20
2.1.3 Eventos cardiovasculares da hipertensão arterial	23
2.1.4 Modelo SHR para o estudo da hipertensão arterial	25
2.2 REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DO CÁLCIO NOS CARDIOMIÓCITOS	26
2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO NO/GMPC / PKG /PDE5A.....	34
2.4 SILDENAFIL E SEU PAPEL CARDIOPROTEÇÃO.....	36
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 MODELO EXPERIMENTAL	40
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	40
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL	40
4.3.1 Medida não invasiva da pressão arterial (pletismografia de cauda).....	40
4.3.2 Medida direta da pressão arterial - Procedimento cirúrgico	42
4.3.3 Avaliação cardiovascular, autonômica e da resposta barorreflexa.....	43
4.3.3.1 Sistema de registro.....	43
4.3.3.2 Avaliação do barorreflexo	43

4.3.4 Determinação de proteínas cardíacas por Western blot.....	45
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6 RESULTADOS.....	48
6.1 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA POR PLETISMOGRAFIA.....	48
6.2 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AVALIAÇÃO AUTONÔMICA.....	48
6.3 TESTE DE SENSIBILIDADE BARORREFLEXA.....	50
6.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS.....	52
7 DISCUSSÃO	54
8 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE A	74

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é caracterizada pelo aumento sustentado dos níveis pressóricos em relação aos valores estabelecidos como fisiológicos: 120 / 80mm Hg (RUBIO-GUERRA, 2018; WILLIAMS et al., 2018). Esse distúrbio de origem multifatorial, acomete uma grande parte da população mundial e representa o mais importante fator de risco para doença cardiovascular (DCV), acidente vascular cerebral (AVC) (KOLETTIS et al., 2010) e insuficiência renal (ELMES et al., 2009). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde/Organização Panamericana da Saúde (OMS/OPAS), (MARKMAN FILHO et al., 2021), cerca de um bilhão de pessoas no mundo sofrem de HA e estima-se que entre 2000 e 2025, cerca de 560 milhões de pessoas serão acometidas por esta doença (POULTER; PRABHAKARAN; CAULFIELD, 2015). No Brasil, as DVC são as principais causas de internamentos e de mortalidade. Os inquéritos populacionais têm indicado que 30 milhões brasileiros são portadores de HA (MARKMAN FILHO et al., 2021).

Uma das complicações da HA é a hipertrofia cardíaca (MUTLAK; KEHAT, 2015; WILLIAMS et al., 2018) a persistente sobrecarga de trabalho que leva a dilatação da câmara ventricular e comprometimento da função contrátil (BERNARDO et al., 2010; NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018). Segundo WANG e colaboradores (2015) na cardiomiopatia hipertensiva ocorre redução da contratilidade cardíaca, da duração da sístole (contração) e da liberação intracelular de Ca^{2+} provavelmente por alteração das proteínas reguladoras deste cátion nos cardiomiócitos. Neste contexto, o músculo ventricular exposto à sobrecarga, expressa maiores níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que contribui para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC) (AFANAS'EV, 2011; LI et al., 2002)

Estudos farmacológicos e genéticos utilizando modelos animais sugerem que a hipertrofia cardíaca e fibrose são potencialmente reversíveis. Vários fármacos anti-hipertensivos e cardioprotetores foram desenvolvidos nas últimas décadas para o manejo da HA, entretanto, alternativas farmacológicas ainda estão sendo exploradas para mitigar

o impacto da doença. O Sildenafil amplamente utilizado durante os últimos 20 anos no tratamento da disfunção erétil (DE) e hipertensão arterial pulmonar (HAP), demonstrou em vários estudos ter um efeito cardioprotetor, modulando a resposta miocárdica durante a estimulação simpática crônica (BORLAUG et al., 2005; ISIDORI et al., 2015; LEE et al., 2010) e melhorando a função endotelial devido a seu efeito antioxidante (LEAL et al., 2020; MAULIK; KUMAR, 2012; SCHWARTZ et al., 2010; YAGUAS et al., 2010)

Recentemente, nosso grupo demonstrou que em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) o Sildenafil melhora a função endotelial mesmo sem alteração da pressão arterial, sendo também observado uma diminuição na progressão da hipertrofia cardíaca e na expressão de alguns marcadores hipertróficos (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019). Outros estudos mostraram uma resposta cardioprotetora do Sildenafil através do aumento da atividade da proteína quinase G (PKG) (SCHWARTZ et al., 2013), da regulação de proteína do linfoma de células B2 (BCL-2)(BORLAUG et al., 2005) e da atenuação das vias de sinalização hipertróficas (TAKIMOTO et al., 2005). Resultados similares foram reportados por (KRISTEK; KOPRDOVÁ; CEBOVÁ, 2007). A partir desses achados, sugere-se também que o Sildenafil possa modular as proteínas envolvidas no manejo do cálcio (Ca^{2+}) no cardiomiócito. Nesse sentido, usando um modelo do desenvolvimento progressivo de doença cardíaca hipertensiva (SHH-SHR), CHEN-IZU e colaboradores (2007) encontraram profundas mudanças na sinalização de Ca^{2+} no início da HA que precedem o desenvolvimento da hipertrofia. Funcionalmente, o aumento induzido no trânsito de Ca^{2+} pela HA causa um acréscimo da contração miocárdica, a fim de manter o débito cardíaco. No entanto, isso pode ativar as vias de sinalização que envolvem a calmodulina (CaM), calcineurina (CN) e proteína quinase dependente de calmodulina II (CaMKII); conhecidas por induzir a expressão de genes pró-hipertróficos (DONG et al., 2012; MOLKENTIN, 2006). Embora, alguns trabalhos tenham mostrado certo efeito cardioprotetor do Sildenafil (HUTCHINGS et al., 2017; SALLOUM et al., 2008; WANG et al., 2015) não se conhece por completo os mecanismos envolvidos na cardioproteção. Nossa hipótese é que o tratamento crônico com Sildenafil, inibidor de fosfodiesterase 5a (PDE5a) modula a resposta barorreflexa e a via do Ca^{2+} em SHR, atenuando desse modo às complicações cardiovasculares próprias da HA em longo prazo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A HA é uma condição patológica caracterizada pelo aumento sustentado dos níveis pressóricos em relação aos valores estabelecidos como fisiológicos: 120 mm Hg de pressão arterial sistólica / 80 mm Hg de pressão arterial diastólica (RUBIO-GUERRA, 2018; WILLIAMS et al., 2018) Esse distúrbio de origem multifatorial, acomete uma grande parte da população mundial e representa o mais importante fator de risco para DCV, ACV (KOLETTIS et al., 2010) e insuficiência renal (ELMES et al., 2008). Sua etiopatogenia é consequente aos fatores genéticos e ambientais que comprometem tanto os vasos sanguíneos, como o coração e mecanismos neuroendócrinos que os regulam (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001).

De acordo com fatores etiológicos e ambientais a HA é classificada em dois tipos: essencial (primária) e secundária. A HA essencial é definida como um estado de pressão alta na qual causas subjacentes como doença renovascular, insuficiência renal, feocromocitoma, aldosteronismo e outras formas mendelianas (monogênicas) não estão presentes, e representa a maior forma de HA no mundo (90% - 95%) (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001; CHEN-IZU et al., 2007). Por outro lado, a HA secundária é aquela em que há um fator etiológico identificado (uma doença subjacente que causa o aumento da pressão arterial). A fisiopatologia subjacente à HA essencial inclui aumento do tônus simpático ou diminuição do tônus vagal, superprodução de hormônios vasoconstritores que favorecem a retenção de sódio (Na^{2+}), aumento da atividade SRAA, deficiência de mecanismos vasodilatadores que envolvem o óxido nítrico (NO), prostaciclina e peptídeos natriuréticos, entre outros (OPARIL; AMIN ZAMAN; CALHOUN, 2003). A ativação do sistema nervoso simpático (SNS) pode contribuir tanto na origem quanto na manutenção da HA (FISHER; PATON, 2012) e vários outros fatores aumentam a PA, incluindo obesidade, resistência à insulina, elevado consumo de álcool e de sal (pacientes sensíveis), envelhecimento, sedentarismo, estresse, baixa ingestão de potássio (K^{+}) e Ca^{2+} (SEVER, POULTER, 1989; CARRETERO, OPARIL, 2000). Esta

doença é associada a risco cardiovascular (WILLIAMS et al., 2018), pois ao aumentar a resistência vascular periférica (RVP) e a pós-carga cardíaca, acaba afetando o funcionamento do coração (MUTLAK; KEHAT, 2015). Neste contexto, uma vez que o músculo cardíaco tem mais trabalho (maior pós-carga), a hipertrofia miocárdica e alterações hemodinâmicas podem surgir, configurando-se ao longo do tempo uma falha múltipla dos órgãos e morte do indivíduo.

2.1.1 Regulação da pressão arterial

A manutenção dos valores de PA dentro dos limites da normalidade é fundamental para o bom funcionamento orgânico, pois garante uma taxa de perfusão tecidual constante que mantém a homeostase dos processos vitais, apesar das mudanças fisiológicas do indivíduo. Segundo TAMARGO, e DELPÓN (2010), a regulação da PA é um processo complexo, determinado pela ação do sistema nervoso autônomo (SNA) e pelos centros de regulação cardiovascular do sistema nervoso central (SNC), sistema endócrino e renal. A regulação nervosa tenta manter valores adequados de PA através da correção e reajuste constante das flutuações hemodinâmicas; mantendo o débito cardíaco, o tônus vascular e a volemia (FISHER; PATON, 2012; GU et al., 2008)

O SNA especialmente o componente simpático, exerce controle da PA através da liberação de noradrenalina, ajustando o débito cardíaco e a RVP, além de influenciar o SRAA (BEEVERS; LIP; BRIEN, 2001). A renina cliva o angiotensinogênio produzido no fígado gerando angiotensina I (Ang I), que dá origem a angiotensina II (Ang II) através da enzima conversora da angiotensina (ECA) (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001). A Ang II é um peptídeo com ações variadas que regula o tônus vasomotor, crescimento celular, apoptose, migração celular e deposição de matriz extracelular (MURPHY et al., 1991). O produto final dessa cascata, a aldosterona, também contribui para a manutenção da PA regulando a excreção renal de sódio.

Outro componente importante do SNC no controle da PA é o hormônio antidiurético (ADH), que participa de várias funções incluindo a regulação da homeostase

dos fluidos corporais, vasoconstrição e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (SHARE, 1988). Esses efeitos fisiológicos são mediados por três subtipos de receptores AVP (V1a, V1b e V2). V2 é expresso nos segmentos distais do rim (JACKSON, 1996) que quando estimulado, ativa a adenilato ciclase (AC), aumentando os níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) que por sua vez estimula a translocação da aquaporina (AQP) -2 para a membrana apical no ducto coletor, aumentando a reabsorção de água. Quanto ADH atua no receptor V1 influencia a contração vascular, aumentando a RVP em situações de hipotensão (AOYAGI; KOSHIMIZU; TANOUE, 2009).

Em nível local, alguns mediadores vasodilatadores e vasoconstritores que contribuem para a regulação da PA, são produzidos e / ou ativados no vaso sanguíneo. Substâncias vasodilatadoras como NO, fator hiperpolarizante dependente do (EDHF), prostaciclina 2 (PGI₂) e outras prostaglandinas e bradicinina; substâncias vasoconstritoras como endotelinas, endoperóxidos, leucotrienos e espécies reativas de oxigênio (EROs) participam deste regulamento (BATLOUNI, 2001) sendo seu desequilíbrio um fator gerador e / ou perpetuador da HA (GOMEZ-ALAMILLO et al., 2003; KÄHLER; COLLESELLI, 2006).

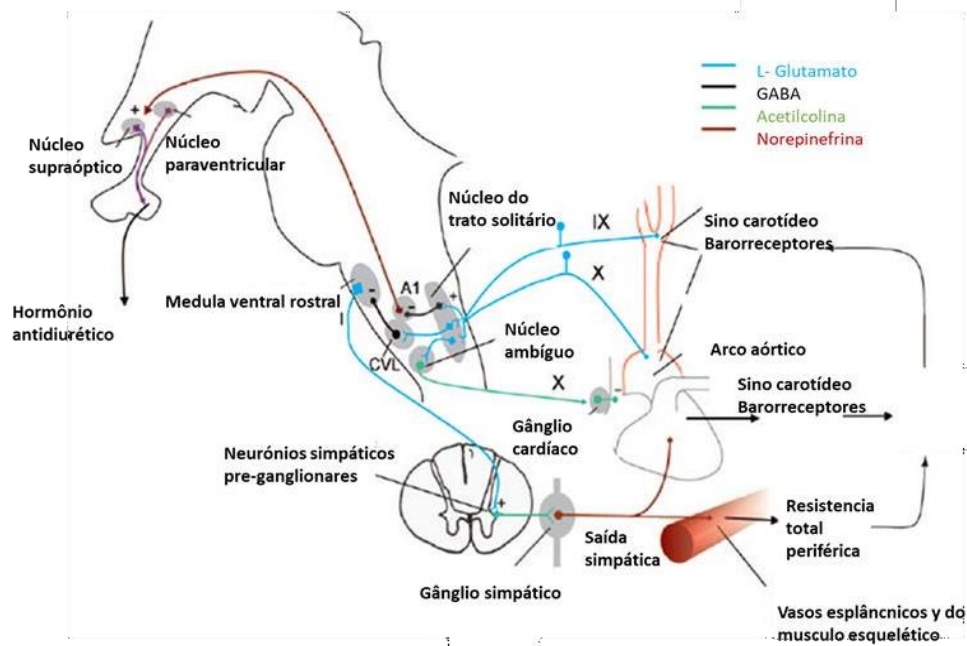
Por último, existem estruturas barorreceptoras na aorta, localizadas no sino aórtico e tronco carotídeo sensíveis à distensão do vaso, cujas sinais são integradas em centros cerebrais de controle vasomotor, operando como mecanismo de retroalimentação e controle constante da PA. Este mecanismo é detalhado no parágrafo seguinte.

2.1.2 Mecanismo barorreflexo e regulação da pressão arterial

O arco barorreflexo arterial é composto principalmente por componentes aferente, neural central e neuro-efetores autonômicos. Os barorreceptores arteriais são o principal componente aferente, os quais são sensores de distinção vascular localizados no gânglio nodoso (NG) e petroso do sino aórtico y tronco carotídeo, respectivamente (ZHANG; MUELLEMAN; LI, 2015). A resposta barorreflexa é um mecanismo fisiológico para modular a atividade cardiovascular através do SNA (FLOREA; COHN, 2014; JESKE et al., 1993; MIKI; YOSHIMOTO, 2018). Durante elevações da PA, há grande deformação da parede dos vasos sanguíneos e ativação dos barorreceptores que geram os potenciais de ação. Os sinais são conduzidos ao núcleo do trato solitário (NTS) via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e vago (fibras aórticas) (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001). Neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca (FC). O tônus simpático cardiovascular é reduzido, uma vez que outros neurônios do NTS, quando estimulados por aumento da PA, excitam o bulbo ventrolateral caudal que inibe os neurônios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral (GERLACH et al., 2019; IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; JESKE et al., 1993; VALENTI et al., 2009a).

Uma característica importante dos barorreceptores é sua capacidade de adaptação. Alterações sustentadas deslocam a faixa de funcionamento destes para o novo nível de PA que passa a ser reconhecido como normal, privando ao organismo desse importante mecanismo que controle regulatório, (CARVALHO-GALVÃO et al., 2018; IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001; SALGADO et al., 2007).

Figura 1. O barorreflexo arterial, organização funcional. Os barorreceptores detectam mudanças no estiramento da parede arterial, os sinais são transmitidos através dos neurônios sensoriais para o SNC onde são integrados e convertidos de sinais excitatórios para sinais aferentes inibitórios que são finalmente transmitidos aos tecidos periféricos para exercer ações reflexas autonômicas



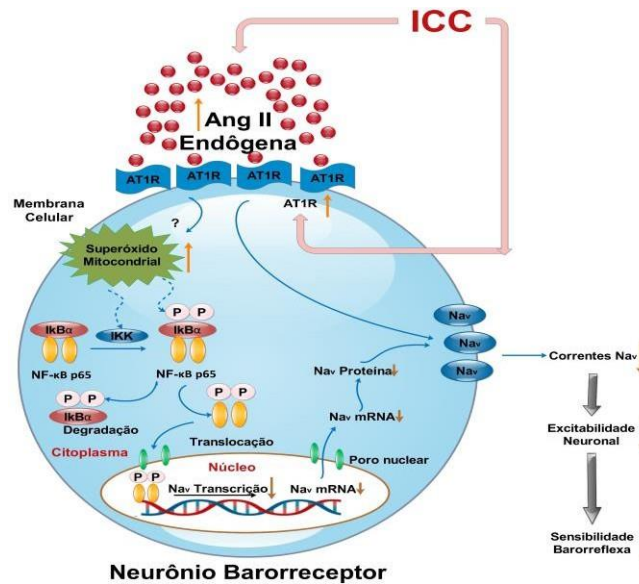
Fonte: BENARROCH (2008).

Dado que a atividade barorreflexa pode ser modulada farmacologicamente, vários estudos foram usados agentes vasopressores e vasodilatadores tais como fenilefrina (FEN) e nitroprussiato de sódio (NPS) respectivamente, para testar tal mecanismo, em condições de normo e hipertensão. Embora existam dados conflitantes, vários autores apontam a que seu mal funcionamento esteja envolvido no desencadeamento da HA (CISTERNAS et al., 2010; IRIGOYEN; KRIEGER, 1998; JUDY; FARRELL, 1979) Al menos em SHR, a atividade barorreflexa está comprometida, (VALENTI et al., 2009a). Os mesmos autores, citando estudos de PALLOT, BARER (1985) indicam alterações morfológicas do corpo carotídeo em SHR adultos e na sensibilidade barorreflexa relacionada a diminuição na neurotransmissão no corpo carotídeo ou mesmo no SNC (GAO et al., 2004). Em pacientes com hipertensão, a sensibilidade do barorreflexo está

significativamente prejudicada, associada ao aumento da espessura da parede vascular do seio carotídeo, (LÁBROVÁ et al., 2005). Esta condição poderia melhorar com o uso de fármacos com propriedades para modular a função cardiovascular. Sildenafil, uma droga usada na disfunção erétil e na HAP por sua ação inibitória da PDE5a, poderia ser considerada como coadjuvante terapêutico na HA (BRUM et al., 2000)(CAVALCANTI et al., 2016)(NETO et al., 2017) (MIKI; YOSHIMOTO, 2018).

Vários estudos demonstram que o controle central da PA é alterado durante a HA possivelmente devido a disfunção autonômica (CAMPAGNARO et al., 2012; IRIGOYEN; KRIEGER, 1998; MANCIA; GRASSI, 2014) e isto pode envolver a participação da Ang II no receptor do tipo I (AT1R) e produção de espécies reativas de oxigênio - EROs (DE QUEIROZ; MONTEIRO; BRAGA, 2013). Em SHR e em humanos, a resposta barorreflexa cardíaca tem sensibilidade diminuída principalmente em consequência à redução da capacidade máxima do componente vagal cardíaco (HEAD; ADAMS, 1992). O desenvolvimento dessa alteração vagal em SHR coincide com o aparecimento de hipertrofia cardíaca (KAWADA et al., 2011; VALENTI et al., 2009a), e progressão da HA. Por outro lado, sabe-se que em condições de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), a Ang II e o AT1R são super expressos no gânglio nodoso (NG) o que contribui para a sua disfunção (ZHANG; MUELLEMAN; LI, 2015). A elevação dos níveis de Ang II endógena (plasmática e no NG) com superexpressão de AT1R em neurônios barorreceptores pode induzir a superprodução de superóxido mitocondrial, regulando positivamente a expressão fosforilada do complexo de quinase: IKK, I κ Ba e NF κ Ba. O fator de transcrição p65 é translocado para o núcleo e diminui a expressão do RNA e da proteína dos canais de Na⁺ ativados por voltagem (Nav). Além disso, a Ang II endógena inibe diretamente a ativação dos canais Nav, conduzindo à disfunção do barorreflexo arterial, visto em ratos com IC (TU et al., 2010; ZHANG; MUELLEMAN; LI, 2015).

Figura 2. Mecanismos responsáveis pelo comprometimento da função do barorreceptor arterial na ICC. Via de sinalização de Ang. II-superóxido-NFκB regula de forma negativa a função dos barorreceptores aórticos influenciando a expressão e ativação dos canais Nav na ICC. Ang. II, angiotensina II; AT1R, receptor da angiotensina II tipo 1; Nav, canal de sódio controlado por voltagem, complexo de quinase IκB (IKK), composto de subunidades de quinase catalítica (IKKα e / ou IKKβ), fator de transcrição (NFκB p 65)



Fonte: Modificado de ZHANG, MUELLEMAN, LI (2015).

2.1.3 Eventos cardiovasculares da hipertensão arterial

Embora, o sistema cardiovascular através da influência neuroendócrina realize ajustes para se adaptar às novas demandas hemodinâmicas impostas pela HA, essas adaptações acabam se tornando patológicas. Assim, observou-se que a estimulação crônica do SNS leva ao remodelamento dos vasos e do miocárdico especialmente do ventrículo esquerdo (VE), seja pela ação direta das catecolaminas nos receptores adrenérgicos, ou pela liberação de fatores tróficos tais como o fator de crescimento transformador beta (TGF-β), fator de crescimento semelhante à insulina1 (IGF-1) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (BROOK; JULIUS, 2000).

A hipertrofia secundária à HA é inicialmente identificada por uma dimensão reduzida na câmara ventricular com aumento da espessura do miocárdio, resultando em hipertrofia concêntrica. A persistente carga de trabalho e a hipertrofia cardíaca levam à dilatação da câmara ventricular com função contrátil comprometida, também denominada hipertrofia excêntrica (BERNARDO et al., 2010; NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018). Segundo LI e colaboradores (2015), na cardiomiopatia hipertrófica ocorre redução da contratilidade cardíaca, da duração da sístole e da liberação intracelular de Ca^{2+} , provavelmente por alteração das proteínas reguladoras do cátion nos cardiomiócitos. Neste contexto, o músculo ventricular exposto à sobrecarga, expressa maiores níveis de NADPH, aumentando o estresse oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento da IC (AFANAS'EV, 2011; LI et al., 2002). Diversos estudos evidenciaram que o desequilíbrio do SRAA contribui para o estresse oxidativo e diminuição da biodisponibilidade do NO endotelial (FLOREA; COHN, 2014; NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011; SILVA et al., 2014) Dessa forma, o miocárdio experimenta não apenas hipertrofia, mas também infiltração de células inflamatórias que terminam em deposição de colágeno, alterando a contratilidade e o relaxamento do músculo cardíaco, bem como suas funções hemodinâmicas (CONRAD et al., 1995)(EMILIO, 2004).

A nível vascular, a disfunção endotelial acompanhada da expressão de mediadores inflamatórios como as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) entre outros, contribuem para o estresse oxidativo, inflamação e deposição de (ÁLVAREZ et al., 2008; BRIONES; TOUYZ, 2010; LEAL et al., 2020) além de desequilíbrio nos fatores vasoativos, acrescentado à rigidez do vaso e à progressão do quadro hipertensivo (AHMEDA; ALZOGHAIBI, 2016). Não menos importante, e como consequência das alterações mencionadas, maior predisposição às lesões ateromatosas e suas implicações da saúde. Essas alterações vasculares não apenas favorecem a progressão da doença hipertensiva, mas também agravam a condição cardíaca, uma vez que a menor distensibilidade do vaso leva a maior RVP e esforço para o coração (pós-carga); sendo iminente a morte do indivíduo sem o apoio farmacológico apropriado.

Em relação ao mecanismo barorreflexo, sua sensibilidade é alterada parcialmente pela desregulação autonômica, o que traz risco cardiovascular (PIZZORNO, RIVERO, PERNA, 2014). Esta sensibilidade é frequentemente definida como uma mudança no intervalo R-R no eletrocardiograma, com base na alteração da PA durante o ciclo cardíaco anterior (EMILIO, 2004). Evidências experimentais indicam que a consequente predominância do tônus simpático pode ajudar a identificar indivíduos após infarto do miocárdio, com alto risco de arritmias e morte (LA ROVERE et al., 2001; SCHWARTZ et al., 1988) marcadores autonômicos de interesse clínico são a variabilidade da FC e a sensibilidade do barorreflexo (LIN et al., 2019).

2.1.4 Modelo SHR para o estudo da hipertensão arterial

Para o estudo da HA alguns modelos murinos foram geneticamente desenvolvidos(LERMAN et al., 2005). O mais utilizado é o SHR obtido a partir de uma colônia de ratos normotensos Wistar Kyoto (WKY) por OKAMOTO e AOKI (1963). A linha foi estabelecida pelo cruzamento entre um macho com HA leve e uma fêmea com HA severa (YEN; WILLARD, 1974). Esses animais começam a desenvolver um aumento nos níveis pressóricos a partir da 4ª semana de vida, atingindo valores de 180-200 mm Hg (CISTERNAS et al., 2010; LIMAS; WESTRUM; LIMAS, 1980). Um sustentado tônus simpático, ativação do SRAA e função barorreflexa alterada, caracteriza o modelo SHR, fato que contribui com a perpetuação da doença (LAWLER et al., 1991). O SHR é um excelente modelo para o estudo da HA essencial em humanos (TRIPPODO, FROHLICH, 1981; ZHOU, FROHLICH, 2007) dadas as semelhanças no desenvolvimento tanto da própria HA como as complicações cardiovasculares subsequentes. Vários estudos tem sido efetuados usando este modelo (GUR et al., 2012; KRISTEK; KOPRDOVÁ; CEBOVÁ, 2007; SCHWARTZ et al., 2013; TAKIMOTO et al., 2005; TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019) entre outros.

A HA provoca disfunções na mobilização do Ca^{2+} no coração de animais com hipertensão(CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2014; LOCATELLI; DE ASSIS; ISOLDI, 2014) Alterações nos níveis da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCAa) e trocador

de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX-1) levam à redução no pico de contratilidade, diminuição na saída do Ca^{2+} intracelular e prolongamento na duração do ciclo cardíaco (HOUSER et al., 2000); esses eventos podem estar relacionados a alteração na função contrátil.

Algumas peculiaridades estruturais e funcionais foram demonstradas na dinâmica do Ca^{2+} no SHR, fato que pode explicar em parte o início e/ou progressão da doença nesses animais. Assim, foi evidenciado um aumento no grau de contração e hipertrofia nos cardiomiócitos; um incremento nas concentrações transitórias de Ca^{2+} tanto em estado pré-hipertensivo como hipertensivo (BROOKSBY; LEVI; JONES, 1993; DUPONT et al., 2012). As propriedades contráteis sugerem uma maior contribuição do trocador sódio e Ca^{2+} do sarcolema NCX-1 para a remoção de Ca^{2+} celular (WARD et al., 2010). Em etapas avançadas, a HA leva à cardiomiopatia com redução da contratilidade cardíaca, menor duração da sístole, liberação intracelular reduzida de Ca^{2+} ; provavelmente por alterações das proteínas reguladoras como a retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) e o fosfolambano (PLB) (LI et al., 2005).

Por fim, alguns estudos forneceram evidências sobre as anormalidades de mitocôndrias no manuseio de Ca^{2+} nos corações de SHRs, as quais são caracterizadas por um potencial da membrana menor, resposta diminuída do poro de transição de permeabilidade nas mitocôndrias (mPTP) para Ca^{2+} , com velocidades mais baixas de captação e liberação em comparação com as mitocôndrias cardíacas oriundas de ratos normotensos WKY (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2008; PARDO; RINALDI; MOSCA, 2015). Segundo os mesmos autores, essas diferenças podem ser causa e / ou consequência do aumento na pressão arterial sistólica (PAS) e da hipertrofia associada; bem como da sinalização nucleoplasmática de Ca^{2+} aumentada, via CaMKII - histona desacetilase 5 (HDAC-5) (PLAČKIĆ et al., 2016).

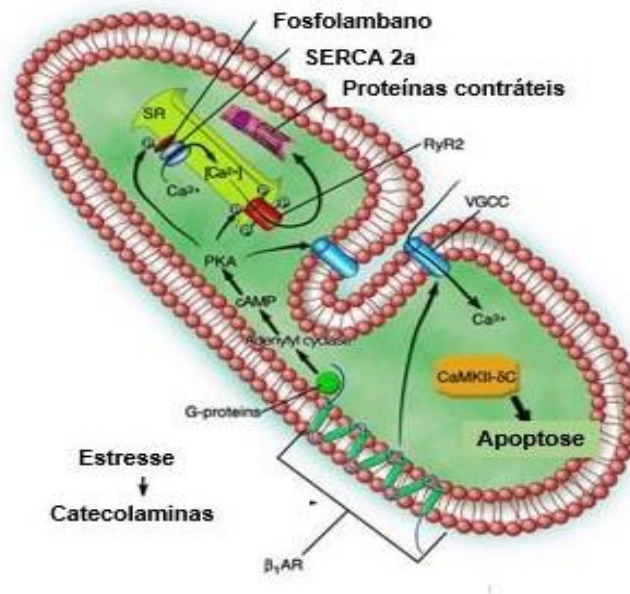
2.2 REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DO CÁLCIO NOS CARDIOMIÓCITOS

O Ca^{2+} cumpre várias funções no coração, está envolvido na geração e manutenção do potencial de ação cardíaco, bem como na ativação da maquinaria contrátil do

sarcômero e como mediador de múltiplos mecanismos de sinalização intracelular (citoplasmática e nuclear), entre outras. As concentrações de Ca^{2+} dentro do cardiomiócito são relativamente baixas sendo finamente reguladas por proteínas e outras moléculas intracelulares que mantêm tal homeostase; evento modulado pela influência do sistema nervoso autônomo, especialmente do componente simpático (Figura 3). Vários estudos mostraram que a sinalização de Ca^{2+} não regulada induz hipertrofia cardíaca na exposição prolongada a HA (CHEN-IZU et al., 2007) e que os genes que codificam as proteínas de modulação de Ca^{2+} são alterados durante a hipertrofia patológica, mas não durante a hipertrofia fisiológica (NAKAMURA, SADOSHIMA, 2018).

O mecanismo de mobilização do Ca^{2+} é constituído por canais seletivos para Ca^{2+} , bombas Ca^{2+} -ATPases, trocadores de Na^+ / Ca^{2+} proteínas ligadoras de Ca^{2+} (CaM e troponina C) e estocadores de Ca^{2+} no retículo endoplasmático (RS) e mitocôndrias. Das proteínas, merecem atenção especial os canais para Ca^{2+} do tipo - L, receptores de rianodina 2 (RyR2), SERCAa, PLB, NCX-1 e calsequestrina 2 (CASQ2). Todas operam em sincronia, e são moduladas por outras moléculas de sinalização intracelular de tipo quinases e fosfatases. Quando a célula é estimulada por um sinal externo, seja um neurotransmissor, hormônios ou outro estímulo, grandes quantidades de Ca^{2+} entram na célula através dos canais do tipo- L, gerando uma mudança em sua polaridade e conseqüentemente a liberação de mais Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS), através de RyR2 , evento conhecido como liberação de Ca^{2+} mediada por Ca^{2+} (REYES-JUÁREZ; ZARAIN-HERZBERG, 2006). Depois de cumprir suas funções dentro da célula, parte do Ca^{2+} é novamente armazenado no RS por mecanismos ativos através da SERCAa, é retido no seu interior por proteínas sequestradoras CASQ2 e calreticulina, enquanto o influxo de Ca^{2+} extracelular é regulado pelo trocador NCX1 localizado na membrana plasmática (KWAN et al., 2009; RAHATE; BHATT; PRABHAVALKAR, 2020).

Figura 3. A conexão receptora β 1-adrenérgico / cálcio. A estimulação do receptor adrenérgico β 1 (β 1AR) é conhecida por ativar o acoplamento excitação-contração cardíaca (EC) por meio da fosforilação de PKA do seguinte: (I) o gatilho para o acoplamento EC cardíaco, o canal de cálcio controlado por voltagem (VGCC); (II) o canal de liberação de cálcio SR RyR2; e (III) a via de captação de cálcio (via fosforilação de fosfolambano pela PKA, que reduz a inibição da SERCA2a). A estimulação β 1AR crônica pode ativar CaMKII (possivelmente através do aumento do influxo de cálcio através do VGCC) e causar apoptose



Fonte: Modificado de (MARKS, 2003).

As mitocôndrias embora em menor grau, também contribuem no armazenamento e regulação das correntes de Ca^{2+} no interior da célula, mediante canais de potássio mitocondriais sensíveis ao trifosfato de adenosina (mitoK-ATP) e o trocador mitocondrial NXC; modificado os aspectos espaciais e temporais da sinalização citosólica deste para diversas funções fisiológicas como o controle da taxa de fosforilação oxidativa, morte celular apoptótica, e produção de ATP (GUNTER et al., 2004; PARDO; RINALDI; MOSCA, 2015) As principais proteínas envolvidas no manejo do Ca^{2+} nos cardiomiócitos são as seguintes:

- *Canais para cálcio do tipo – L*: consistem em uma subunidade α_1 central de formação de poros que expressa as principais propriedades biofísicas e funcionais do canal, às quais está associado um número de subunidades auxiliares, α_{1c} , δ , β (TRIGGLE, 2006). A subunidade α_{1c} forma a estrutura através da qual o Ca^{2+} entra. Além disso, acredita-se que possui locais que podem ser fosforilados específicos para proteína quinase A (PKA), CaMKII e PKC as quais regulam sua atividade (SAPIA, 2009). Do ponto de vista eletrofisiológico, existem duas classes principais desses canais: ativados por baixa e alta voltagem, sendo pertencentes a esta última categoria os de tipo- L, particularmente, embora não exclusivamente, associado ao sistema cardiovascular. Em resposta à despolarização do sarcolema, o Ca^{2+} entra através do canal tipo- L dependente de voltagem, que estimula diretamente RyR2 incorporados no RS, induzindo uma liberação muito maior de Ca^{2+} , aumentando em mais de 10 vezes a concentração deste, gerando contração do cardiomiócito (MOLKENTIN,2006).
- *Receptor rianodina 2 (RYR2)*: Três isoformas de RyR2 foram descritas codificadas por três genes diferentes (Ryr1, Ryr2, Ryr3) sendo a isoforma RyR2 expressa no músculo cardíaco (MARKS et al., 1989). O RyR2 cardíaco é o maior canal de íons conhecido até o momento, funciona como um tetrâmero (RUEDA; DE ALBA-AGUAYO; VALDIVIA, 2014) que na região amino-terminal contém vários domínios reguladores que controlam as propriedades de abertura do poro do terminal carboxila. A região amino-terminal fornece propriedades da proteína de andaime ao RyR2 localizando inúmeras proteínas reguladoras chaves do complexo (REYES-JUÁREZ; ZARAIN-HERZBERG, 2006). A liberação de Ca^{2+} do RS cardíaco seria mediada principalmente pelo RyR2 e em parte pelo receptor de 1,4,5-trifosfato inositol (IP3) (SAPIA, 2009).
- *Calmodulina (CaM)*: é uma proteína ubíqua de ligação a Ca^{2+} que se junta a RyR2 na diástole e modula a função do canal, inibindo a probabilidade de abertura de RyR2 em concentrações fisiológicas de Ca^{2+} , se une a CaM, estabilizando o estado fechado dos canais de RyR2 no estado de repouso das células (YAMAGUCHI et al., 2003). Nos cardiomiócitos, a afinidade CaM-RyR2 é reduzida

em condições patológicas. O estresse de cardiomiócitos adultos pela exposição a Ang II ou por constrição aórtica transversa (TAC) causa dissociação de CaM do RyR2 e translocação para o núcleo junto ao receptor quinase acoplado a proteína G (GRK5) com exportação nuclear paralela da HDAC5, favorecendo a transcrição gênica pró-hipertrofica (ODA et al., 2018). O GRK5 possui locais de ligação a CaM em cada domínio terminal, sendo o N-terminal mais crítico na regulação da hipertrofia cardíaca, comportando-se com um acelerador dessa condição quando acumulado no núcleo (PRONIN et al., 1997).

- *Calsequestrina 2 (CASQ2)*: é a proteína mais abundante no interior do RS, onde constitui a principal proteína da ligação ao Ca^{2+} e é capaz de armazená-lo em quantidade suficiente para permitir contrações repetidas. Existem duas isoformas de CSQ descritas, codificadas por genes diferentes (CASQ1 e CASQ2), sendo a isoforma CASQ2 encontrada no músculo cardíaco (REYES-JUÁREZ; ZARAIN-HERZBERG, 2006), associado à membrana do RS nas áreas de junção na proximidade dos "pés" do RyR, ancorado por meio de interações com triadina e juntina. As quatro proteínas formam um complexo central para a liberação de Ca^{2+} que pode detectar a concentração de Ca^{2+} nos compartimentos citoplasmáticos e do lúmen do RS, permitindo a regulação apropriada da carga de armazenamento e liberação do cátion através dos RyRs (NOVÁK; SOUKUP, 2011).
- *SERCAa*: são proteínas pertencentes a famílias de enzimas dependentes de ATP, altamente conservada, que transportam ativamente Ca^{2+} para o RS. São codificados por três genes homólogos chamados SERCA-1, SERCA-2 e SERCA-3, sendo a isoforma SERCA2a predominantemente expressa no músculo cardíaco (REYES-JUÁREZ; ZARAIN-HERZBERG, 2006). A SERCA2a está envolvida no bombeamento de Ca^{2+} do citoplasma para o RS durante o relaxamento muscular; catalisando o gradiente eletrogênico de 2 íons de Ca^{2+} por uma molécula de ATP hidrolisada (MOLKENTIN, 2006). No cardiomiócito, SERCA2a é regulada por PLB. Em sua forma desfosforilada, PLB diminui a afinidade de SERCA2 por Ca^{2+} e, portanto, inibe seu sequestro pelo RS. Quando o PLB é fosforilado, o efeito inibidor desaparece, acelerando o relaxamento e aumentando a carga de Ca^{2+} do

RS, o qual ficará disponível para liberação na próxima contração, através do RyR2 (REYES-JUÁREZ; ZARAIN-HERZBERG, 2006).

- *Fosfolambano (PLB)*: é uma proteína que atua como um inibidor endógeno da SERCA2a. É expressa principalmente no músculo cardíaco (SIMMERMAN et al., 1996). Normalmente, a sinalização β -adrenérgica resulta em fosforilação via PKA de PLB, aliviando a inibição de SERCA2a e aumentando a contratilidade (FRANK; KRANIAS, 2000).
- *Trocador NXC1*: é um transportador eletrogênico localizado na membrana citoplasmática. Em condições normais, sua principal função é trocar 1 Ca^{2+} por 3 Na^+ (modo direto), podendo funcionar de forma reversa por um período muito curto, no pico da despolarização e sob condições especiais (altas concentrações de Na^+ intracelular) (ULATE MONTERO; ULATE CAMPOS, 2006). Defeitos no NXC1 levam à diminuição da contratilidade de miócitos, redução da remoção intracelular de Ca^{2+} e duração prolongada do ciclo cardíaco, sendo essas, características da insuficiência ventricular em estágio terminal (LI et al., 2015; HOUSER et al., 2000).

Em circunstâncias fisiopatológicas, a expressão e/ou funcionamento das proteínas descritas acima sofre alterações. Desta maneira, em resposta a estímulos causadores de doenças, o miocárdio é diretamente influenciado por fatores de crescimento, neuroendócrinos e/ou citocinas que induzem remodelação ventricular, hipertrófica dos miócitos e alterações na viabilidade destes (MOLKENTIN, 2001); promovendo ademais a ativação de proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), CN, PKC, CaMK e componentes da via IGF-1, entre outros; a maioria dos quais exigem aumentos no Ca^{2+} para serem ativados (MOLKENTIN, 2006).

A CN por exemplo, é uma fosfatase serina / treonina dependente de Ca^{2+} / CaM expressa em vários tecidos, que após ser ativada pelo Ca^{2+} pode desfosforilar vários fatores de transcrição, tal como o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) em nível cardíaco. Este último faz parte de uma família de fatores de transcrição que respondem

ao aumento do Ca^{2+} citoplasmático (PUTNEY, 2012), que sendo translocado para o núcleo da célula favorece a expressão gênica, sendo sub expresso na hipertrofia miocárdica (MARKS, 2003; SCHULZ; YUTZEY, 2004) re-fosforilação dos mesmos locais pelo glicogênio sintase-quinase-3 β (GSK3 β) e outras quinases promovem a exportação nuclear de NFAT e finaliza o sinal de CN para o núcleo (VEGA, 2003). A atividade da CN pode ser testada através da análise da responsividade transcricional do NFAT. De fato, o NFAT é ativado apenas pela CN, e a translocação nuclear é diretamente proporcional ao grau de ativação da CN *in vivo*, (RAO; LUO; HOGAN, 1997) (MOLKENTIN, 2004).

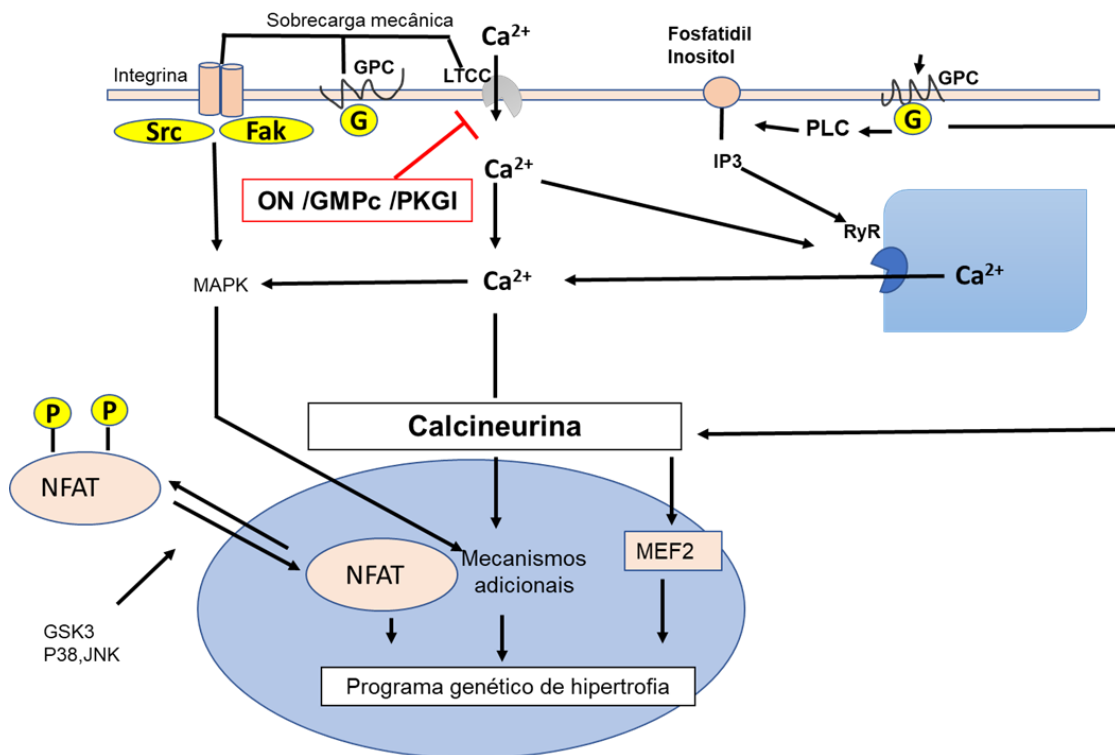
A CN também demonstrou aumentar a atividade de uma quinase não identificada que fosforila HDAC-5. As histonas desacetilase II (HDAC-II) agem como repressores responsivos ao sinal da hipertrofia cardíaca, pelo menos em parte, interagindo com o fator potenciador específico de miócitos 2 (MEF2) e suprimindo sua capacidade de ativar o programa de genes fetais. A fosforilação dos HDAC-II leva à sua inativação através da exportação nuclear e promoção do programa de hipertrofia cardíaca (CHENG et al., 2011; VEGA; BASSEL-DUBY; OLSON, 2003).

GSK3 β é uma proteína-quinase serina/treonina inicialmente descrita como uma enzima envolvida no metabolismo do glicogênio; embora como mencionado anteriormente, GSK3 β antagoniza as ações da CN, fosforilando diretamente o NFAT e estimulando sua exportação nuclear. Vários estímulos hipertróficos demonstraram inibir a atividade da GSK3 β , o que teria o efeito de aumentar a sinalização da CN. Camundongos transgênicos que expressam uma forma constitutivamente ativa de GSK3 β no coração, são resistentes à hipertrofia em resposta à ativação da CN pela infusão de adrenalina e sobrecarga de pressão (PASSIER, et al., 2000; VEGA, 2003).

Outro fator que interage com o Ca^{2+} é a proteína quinase dependente de calmodulina II (CAMK II), uma quinase dependente de Ca^{2+} / calmodulina, cuja função principal é fosforilar a HDAC 5. Esta última, normalmente reprime a ativação transcricional hipertrófica, no entanto, a fosforilação de HDAC5 por GRK5, proteína-quinase D ou CaMKII em resposta a estímulos neuro-humorais e IC, promove a exportação nuclear de HDAC5. Desse modo, ativa a expressão de vários genes que determinam um programa

de hipertrofia de cardiomiócitos (BERS; GUO, 2005; ODA et al., 2018; ULATE MONTERO; ULATE CAMPOS, 2006).

Figura 4. Via de sinalização pró-hipertrofica Ca^{2+} - calcineurina – NFAT e controle inibitório em múltiplos níveis. TLCC: Canais de Ca^{2+} de tipo L, IP3: Inositol trifosfato, DAG: Diacilglicerol, ON: óxido nítrico, PLC: Fosfolipase C, GMPc: guanosina monofosfato cíclico, PKGI: Proteína cinase I, RyR: Receptor de Rianodina, NFAT: Fator nuclear de células T ativadas, MAPK: Proteína quinase ativadora mitogénica, Src: Tirosina quinases coativadoras de receptores esteroidais, Fak: quinase de adesão focal, GSK3: Glicogênio sintase-quinase-3 β , JNK: Quinases N-terminais de Jun, P38: Proteínas quinases ativadas por mitogénio p38 (MAPKs), P: fósforo, MEF2: Fator potenciador específico de miócitos 2.



Fonte: Modificado de (FIEDLER; WOLLERT, 2004) e (GARCIA, INCERPI, 2008).

Por fim, em relação às proteínas cujo funcionamento está intimamente ligado ao Ca^{2+} , a troponina I (TnI) é a unidade inibitória do complexo da troponina associada ao filamento fino e inibe as interações da actomiosina com o Ca^{2+} durante a diástole. (SOLARO, 2011; MARTINS, 2009). A fosforilação de resíduos específicos de serina e treonina no TnI por quinases diferentes representa um importante mecanismo fisiológico

para alteração das propriedades do miofilamento (LAYLAND; SOLARO; SHAH, 2005). Segundo os mesmos autores, a contribuição da fosforilação de TnI pela PKG para alterações gerais na função contrátil é difícil de determinar, especialmente porque a PKG pode ter outros efeitos, como a redução da corrente de canais de Ca^{2+} do tipo-L ou a captação aumentada de Ca^{2+} pelo RS. Além disso, agentes como o NO que aumentam a monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) podem ter efeitos adicionais não dependentes do GMPc, enquanto o próprio GMPc pode influenciar a atividade de várias fosfodiesterases e assim, modular a função alterando os níveis de (LAYLAND; SOLARO; SHAH, 2005) Outros estudos mostraram que a inibição da PDE5a leva a alterações na modulação adrenérgica no coração, onde o receptor adrenérgico β_3 ($\beta_3\text{AR}$) tem sido associado aos efeitos da inibição da PDE5, levando a uma resposta inotrópica negativa, através da fosforilação por PKG de troponina I (LEE et al., 2010; WEST et al., 2019).

2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO NO/GMPC / PKG / PDE5A

A via de sinalização mediada pelo NO é outro alvo de estudo na HA e suas implicações no nível cardiovascular. O NO é um gás diatômico formado pela oxidação do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (ANDERSSON, 2018), que consegue difundir livremente através das membranas celulares e de induzir diversos eventos fisiológicos (DERBYSHIRE; MARLETTA, 2009). A regulação da atividade da eNOS na via eNOS-NO é mais pronunciada na HA e no remodelamento cardiovascular (FLEMING, 2010; YE et al., 2019). O NO atua mediante a ativação da cascata guanilato-ciclase (GC)/ GMPc/ PKG com um papel preponderante na regulação do relaxamento muscular e ativação gênica (DAS; XI; KUKREJA, 2008; RIVERO VILCHES et al., 2001).

As GC fazem parte da superfamília de nucleotídeos ciclase, amplamente distribuída no organismo, estando em forma particulada (GCp) na membrana e em forma solúvel (GCs) imersa no citoplasma (RIVERO VILCHES et al., 2001). Em relação ao músculo cardíaco, a GCp é estimulada por peptídeos natriuréticos (NPs) liberados em resposta à sobrecarga miocárdica, ativando a via GMPc/PKG e regulando a

contração/relaxamento, expressão gênica, crescimento celular e apoptose (KUKREJA; SALLOUM; DAS, 2012). Por outro lado, em nível vascular, o NO pode interagir com os GCs ativando a mesma rota indicada acima, o que leva a vasodilatação através da inibição dos canais para o Ca^{2+} e a ativação de fosfatases de miosina (CAWLEY et al., 2007).

O GMPc é o segundo mensageiro intracelular que medeia a ação do NO e NPs, regulando uma ampla gama de processos fisiológicos no sistema cardiovascular, incluindo contratilidade cardíaca, tônus vascular, função plaquetária e remodelação cardíaca e vascular (FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011; TAKIMOTO, 2012). O GMPc exerce sua ação fisiológica através da proteína quinase dependente de GMPc (PKG), fosfodiesterases reguladas por GMPc (PDE2, PDE3) e canais catiônicos dependentes de GMPc, entre os quais o PKG pode ser o mediador primário.

Recentes estudos exploraram os mecanismos “downstream” nos quais o NO e o GMPc promovem efeitos anti-hipertroficados no cardiomiócitos. A interferência com uma via pró-hipertrofica dependente da proteína quinase LIM muscular (LIMK1), constitui um mecanismo importante. Além disso, a inibição da via Ca^{2+} - CN – NFAT em múltiplos níveis parecem ser de importância crítica (FIEDLER; WOLLERT, 2004; HOLTWICK et al., 2003). O equilíbrio entre a síntese e degradação de GMPc é regulado pelas enzimas fosfodiesterases (PDEs).

As PDEs são enzimas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos (GMPc, AMPc) para forma inativa (5'-GMP, 5'-AMP), regulando assim a duração e a amplitude da sinalização de nucleotídeos cíclicos (KALRA et al., 2003; TAKIMOTO, 2012). Algumas PDEs têm função mista (I, II, III, X, XI) sendo capazes de hidrolisar tanto AMPc quanto GMPc (ANDERSSON, 2018; FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011; KERAVIS; LUGNIER, 2012) outras com maior especificidade para o GMPc (V, VI, IX) e com função restrita (IV, VII, VIII) ao (KUKREJA; SALLOUM; DAS, 2012; WEST et al., 2019) Dessa forma, elas podem modular os eventos fisiológicos relacionados a sinalização NO / GC / GMPc / PKG (BENDER; BEAVO, 2006).

A PDE5a é uma esterase específica de GMPc, expressa em abundância no músculo liso vascular. Embora, originalmente não se pensasse que o PDE5a fosse

expresso no coração, em alguns estudos foram associados tanto a regulação da sinalização adrenérgica, tanto fisiológica quanto patológica (MAURICE et al., 2014; WEST et al., 2019). A expressão de PDE5 é regulada positivamente no coração doente por meio de um mecanismo dependente do estresse oxidativo e é ativada pela ligação de GMPc ao domínio GAF e pela fosforilação de PKG em Ser 92 (FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011; ISIDORI et al., 2015)

A PKG é uma proteína-quinase dependente de GMPc, identificada como o principal alvo “downstream” mediando os efeitos anti-hipertroóficos do NO e GMPc (FIEDLER, WOLLERT, 2004). Os alvos para PKG incluem o canal tipo- L para Ca^{2+} , PLB e TnI (ZHAO, GREENSTEIN, WINSLOW, 2016), também ativa o regulador da sinalização da proteína G 2 (RGS2) e RGS4, os quais por sua vez inibem a sinalização do receptor acoplado à proteína G (GPCR) e suprimem a hipertrofia patológica (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018).

2.4 SILDENAFIL, UM INIBIDOR DE PDE5A E SEU PAPEL NA CARDIOPROTEÇÃO

A regulação farmacológica da via NO/GMPc/PKG tem sido estudada, permitindo o desenvolvimento nas últimas duas décadas de uma variedade de fármacos com capacidade de inibir as PDEs e modular este mecanismo de sinalização intracelular; com potencial terapêutico para diversas DCV, incluindo hipertensão, cardiomiopatia isquêmica, IC, ACV, e disfunção cardíaca na distrofia muscular de Duchenne, entre outras (MAURICE et al., 2014).

Sildenafil é um inibidor de PDE5a que foi aprovado inicialmente para o tratamento de disfunção erétil em 1998 (GOLDSTEIN et al., 1998) e aprovado para o tratamento da HAP em 2005 (GALIE et al., 2005). É um composto aromático solúvel em água, estruturalmente semelhante ao GMPc (KOLETTIS et al., 2010). Foi a primeira molécula descoberta capaz de inibir a PDE5a, ao ocupar seu sítio catalítico como um pseudo substrato; mantendo assim os níveis de GMPc por maior tempo. Nos últimos anos a indústria farmacêutica sintetizou e ofereceu ao mercado fármacos similares, inibidores de PDE5a como o verdanafil, tadalafil e avanafil entre outros, para o tratamento de

diversas doenças (ANDERSSON, 2018). Devido ao seu efeito relaxante muscular, o Sildenafil tem sido utilizado nos últimos 20 anos para tratar vários distúrbios, além da disfunção erétil e HAP, tais como angina do peito e alguns problemas do trato urinário inferior (GUR et al., 2012). Ademais, em modelo murinos, o fármaco promove cardioproteção em parte através de sua interação e regulação das proteínas da via do Ca^{2+} e dos fatores sinalizadores pro e anti-hipertrofos em cardiomiócitos, embora se acredita na existência de outros mecanismos de sinalização envolvidos nessa atividade.

Camundongos submetidos a TAC tratados com Sildenafil, restauraram a expressão gênica e proteica da SERCA2a e PLB, bem como o aumento da fosforilação de PBL (NAGAYAMA et al., 2009). No mesmo estudo, foi visto que expressão de CN e a ativação de PKC α (translocação da membrana externa) foram aumentadas pelo TAC crônica e reduzidas pelo tratamento com Sildenafil. Estudos utilizando o modelo de TAC em ratos, mostraram que a inibição da PDE5a com Sildenafil atenua o estresse do RS e melhora a função cardíaca in vivo e in vitro, protegendo contra lesão do miocárdio durante a reperfusão pós-isquêmica (GONG et al., 2013; MADHANI et al., 2010) aumentando a fosforilação da Phospholemman (PLM), proteína acessória que faz parte do complexo de bomba cardíaca Na^+/K^+ ATP-ase regulando sua atividade de maneira análoga à regulação que PBL exerce sobre a SERCA2a (SHATTOCK, 2009).

O Sildenafil atenua a cardiomiopatia isquêmica e melhora a função ventricular esquerda em camundongos, dado seus potentes efeitos protetores contra a necrose e apoptose após isquemia-reperfusão no coração intacto (SALLOUM et al., 2008). Segundo SCHWARTZ e colaboradores (2013), os inibidores de PDE5a reduziram a extensão do infarto em modelos animais quando administrados antes da oclusão coronariana, mostrando diminuição no grau de hipertrofia, preservando a fração de encurtamento e melhorando a sobrevivência através da fosforilação de canais de K^+ via GMPc/PKG. No mesmo sentido, o Sildenafil conferiu cardioproteção através da ativação de canais mitocondriais (mito KCa^{2+} e mito-KATP) (WANG et al., 2008) e da regulação do fator anti-apoptótico (BCL-2), que atenua a permeabilidade mitocondrial, a liberação do citocromo C e a ativação da caspase 3 (BORLAUG et al., 2005; DAS et al., 2009; DAS; XI; KUKREJA, 2008).

Outros autores mostraram que o Sildenafil regulou os níveis do Ca^{2+} em miócitos ventriculares de ovinos, onde suprimiu as ondas induzidas pela elevação do Ca^{2+} externo, possivelmente pela atenuação dos canais tipo-L de Ca^{2+} e fosforilação de PLB (HUTCHINGS et al., 2017). No mesmo sentido TAKIMOTO e colaboradores (2005) mostraram em camundongos que o Sildenafil desativa múltiplas vias de sinalização na hipertrofia induzida por sobrecarga: sinalização da calcineurina / NFAT, fosfoinositídeo-3 quinase (PI3K) / Akt e ERK1 / 2; no entanto não tem efeito na hipertrofia induzida pela super expressão de CN *in vitro* ou PKB *in vivo*, sugerindo variantes dessas vias de sinalização.

A eficácia do Sildenafil nas DCV parece estar relacionada também ao seu papel primário na função endotelial, mantendo a função regulatória de vários processos como inflamação, agregação plaquetária, proliferação de miócitos vasculares (SCHWARTZ et al., 2010) e modulando a resposta celular miocárdica frente ao aumento do tônus simpático (ISIDORI et al., 2015). Segundo LEAL e colaboradores (2020), o Sildenafil reverte a disfunção endotelial em SHR, melhorando o relaxamento vascular à acetilcolina com maior biodisponibilidade de NO, reduzindo o estresse oxidativo e os prostanóides COX-1, além de melhorar a sinalização de GMPc / PKG.

Os efeitos antioxidantes do Sildenafil também foram vistos em ratos (KRISTEK; KOPRDOVÁ; CEBOVÁ, 2007; YAGUAS et al., 2010; MAULIK, KUMAR, 2012), camundongos (DAS; XI; KUKREJA, 2008) e humanos (LU et al., 2010). SHR que receberam tratamento crônico com Sildenafil apresentaram melhora na integridade e função endotelial (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019)(LEAL et al., 2018). Por outro lado, KOUPPARIS e colaboradores (2005) mostraram seu efeito na redução do estresse oxidativo, reduzindo a produção do íon superóxido nas células musculares lisas dos corpos cavernosos, através da inibição da NADPH oxidase, mesmo efeito também observado em modelo porcino, tanto em células endoteliais de vasos sanguíneos pulmonares (MUZAFFAR et al., 2005) como em tecido cardíaco (WANG et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento crônico com Sildenafil sobre a resposta barorreflexa e sobre a via do Ca^{2+} cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em SHR adultos tratados e não tratados com Sildenafil serão avaliados:

- Os parâmetros cardiovasculares pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e frequência cardíaca intrínseca (FCi).
- O tônus vagal (TV) e tônus simpático (TS) sobre o coração.
- A resposta barorreflexa frente a administração de fenilefrina (FEN) e nitroprussiato de sódio (NPS), em animais acordados.
- Determinar, por western blotting a expressão das proteínas reguladoras do Ca^{2+} : CASQ2, pTnI, NXC, SERCA2a, e pCaMKII em tecido cardíaco.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 22 ratos da linhagem SHR, machos, com 4 meses de idade, obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (DFF-UFPE). Os animais foram alojados em racks ventilados (Tecniplast®), em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro-escuro de 12 horas, umidade (55%), com livre acesso à água e ração.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

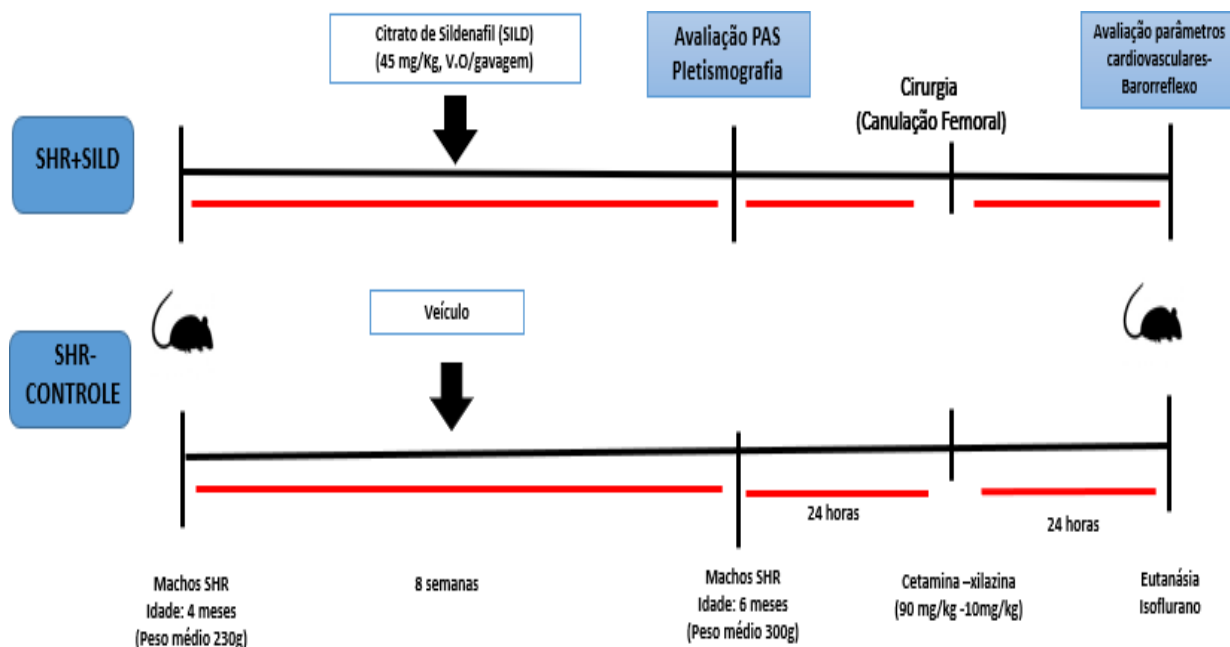
Todos os protocolos experimentais foram realizados dentro dos princípios éticos em pesquisa animal, determinados pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (CONCEA), com a devida autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (nº 108/2019). As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LFFCV-UFPE).

4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

4.3.1 Medida não invasiva da pressão arterial (pletismografia de cauda)

Um total de 14 animais foram randomizados em dois grupos. Um grupo experimental denominado SHR-SILD (n =7) tratado com Sildenafil (45 mg/kg/dia, V.O. por gavagem), durante dois meses; um grupo denominado SHR-CONTROLE (n =7), o qual recebeu apenas veículo. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, sob as mesmas condições ambientais e nutricionais (dieta comercial padrão, Nuvilab®). O peso dos animais foi registrado periodicamente (cada 3 dias) para o reajuste da dose. No final do tratamento, a PAS foi registrada através de método indireto (pletismografia de cauda).

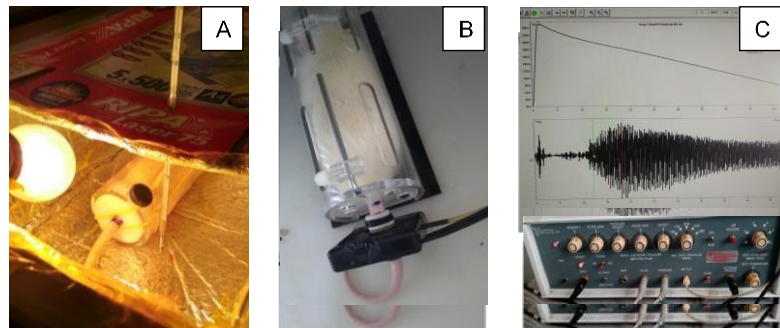
Figura 5. Desenho experimental (a). Subgrupo de animais tratados para registro de parâmetros cardiovasculares y avaliação barorreflexa.



Fonte: o autor (2021).

Antes do registro os animais passaram por um processo de adaptação ao dispositivo de contenção e aquecimento à 35° C, utilizando uma lâmpada, (Imagem 1 A e B) durante 8 dias, a fim de diminuir o estresse e mudanças na PA ao novo estímulo. No momento do registro, os ratos foram mantidos no dispositivo de contenção por 15 minutos, sob as condições de temperatura descritas anteriormente. Os registros foram realizados através de sensor de pulso que foi colocado ao redor da cauda e conectado ao pletismografo (IITC Life Science B60-7/16. Woodland Hilss, EUA). Foi utilizado o software BpMonWin.exe (Imagem 1C).

Imagem 1. Procedimento para o registro da pressão arterial não invasiva. Sistema de aquecimento e contenção, (Painel A), Posicionamento do sensor de registro (Painel B), Equipamento de pletismografia e interface do programa para aferição da PAS (BpMonWin.exe) (painel C).

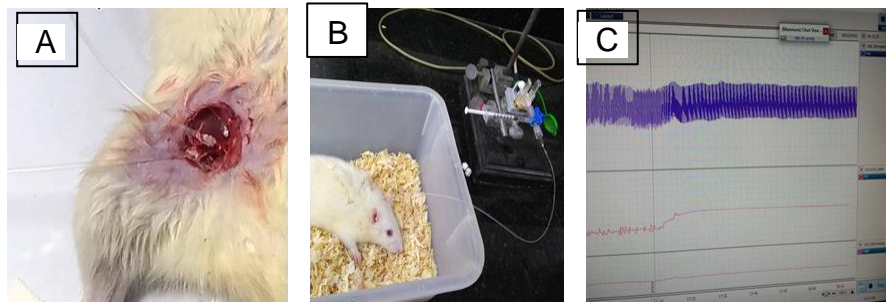


Fonte: o autor (2021).

4.3.2 Medida direta da pressão arterial - Procedimento cirúrgico

48 horas após o registro por pletismografia, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (90mg/kg e 10mg/kg IP, respectivamente) e submetidos a cirurgia para inserção de duas cânula de polietileno (PE10 conectado a PE50), heparinizadas, uma na aorta abdominal através da artéria femoral direita, para o registro de parâmetros cardiovasculares; outra na veia femoral, para a administração de fármacos (Imagem 2A). Ambas cânulas foram expostas em nível dorsal (Imagem 2B). Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam penicilina sódica (24.000 UI/kg, i. m.) e ibuprofeno 15 mg/kg (2,5ml/500ml água de beber). Os animais foram alojados em gaiolas individuais nas mesmas condições de manejo (conforme descrito anteriormente).

Imagem 1. Procedimento para o registro da pressão arterial invasiva. Inserção de cateteres de polietileno na artéria e veia femoral esquerda (painel A), cânula arterial exteriorizada dorsalmente e conectada a um transdutor de PA, (painel B) ligado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 4/30, ML866; ADInstruments, Austrália), interface do software (painel C).



Fonte: o autor (2021).

4.3.3 Avaliação cardiovascular, autonômica e da resposta barorreflexa

4.3.3.1 Sistema de registro

As mensurações dos parâmetros cardiovasculares foram realizadas 24 horas após a cirurgia, a cânula arterial foi conectada a um transdutor de PA (MLT0380; ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Nova Gales do Sul, Austrália) acoplado a um amplificador e um sistema de aquisição (Bridge Amp, ML224 e PowerLab 4/30, ML866; ADInstruments Australia, (Imagem 2B e C). Após um período de 30 minutos de estabilização, a PAS, PAD e FC foram registradas. A pressão arterial média (PAM) foi calculada através da fórmula: $PAD + [(PAS - PAD)/3]$.

4.3.3.2 Avaliação do barorreflexo

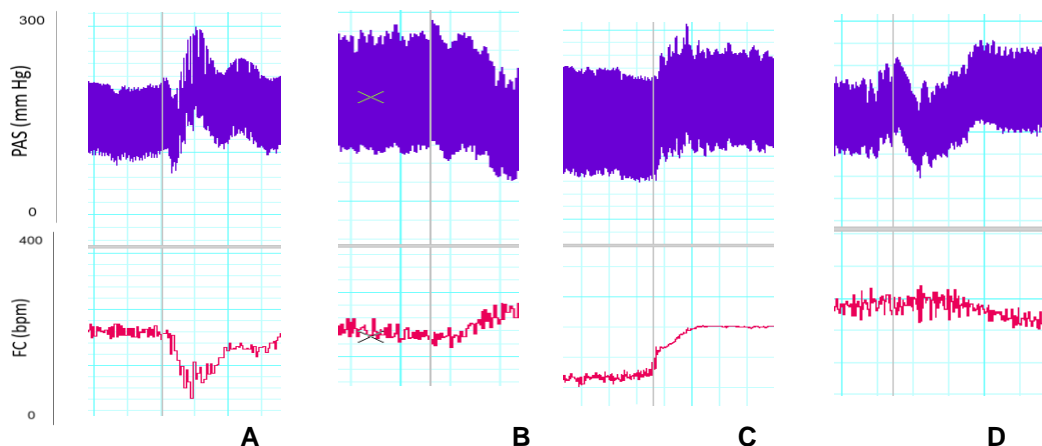
Após o registro de PA e um repouso de 30 minutos a sensibilidade barorreflexa foi avaliada através da infusão de fenilefrina (FEN, um agonista alfa-adrenérgico) em *bolus* de doses crescentes (0,25; 0,5; 1; 2, 4 ug/ kg, I.V) que promovem

vasoconstrição com consequentes aumentos da PA e em resposta uma bradicardia reflexa. As doses foram injetadas com intervalos de 5 min. Após 30 min, foram injetadas em *bolus* de doses crescentes (0,5; 1; 2; 4; 8 µg/kg, I.V.) nitroprussiato de sódio (NPS), um potente vasodilatador, que ao reduzir a PA induz taquicardia reflexa, estimulada pelos barorreceptores. A Imagem 3 (A, B) mostra traçados representativos do comportamento da PAS e da FC frente à FEN e NPS. A responsividade (ganho do reflexo barorreceptor) foi determinada por regressão linear, a qual relaciona as variações reflexas causadas na FC com as variações promovidas sobre a PAM ($\Delta FC/\Delta PAM$), o que permite a avaliação de respostas bradicárdicas e taquicárdicas separadamente (FARAH et al., 1999), (Figura 7).

Por último, o componente autonômico e a frequência cardíaca intrínseca (FCI) foram avaliadas por bloqueio farmacológico do SNA. Foram usados bloqueios farmacológicos autonômicos unilaterais que permitiram a medida do tônus vagal (TV) e tônus simpático (TS) e duplos bloqueios para a determinação da FCI. Para isso, no animal em repouso, foi administrada atropina (bloqueador muscarínico, 1 mg/ kg-1, iv; Sigma) e após um intervalo de 15 minutos foi administrado propranolol (bloqueador β -adrenérgico, 1 mg/kg-1, iv; Sigma). A Imagem 3 (C e D) mostra traçados representativos do comportamento da PAS e da FC quando administrados os fármacos citados. A FC foi registrada antes e após a administração de cada um dos medicamentos. O procedimento foi repetido no dia seguinte, invertendo a ordem de aplicação dos fármacos. A FCI foi estimada como a soma e posterior divisão dos valores de FC pós-atropina e pós-propranolol. Dessa forma, a média dos valores obtidos no primeiro e no segundo dia foi considerada como a FCI do animal.

Por outro lado, o tônus simpático cardíaco foi estimado pela diferença entre a FC após a atropina e a FCI, enquanto o tônus vagal foi considerado a diferença entre a FCI e a FC após o propranolol : $TV = FCI - FC \text{ após propranolol}$, $TS = FC \text{ após atropina} - FCI$.

Imagem 2. Traçados representativos do comportamento da PAS e da FC ao desafio com os fármacos: vasoconstritor -FEN (painel A), vasodilatador -NPS (painel B), bloqueador colinérgico - Atropina (painel C) e bloqueador adrenérgico -propranolol (painel D).

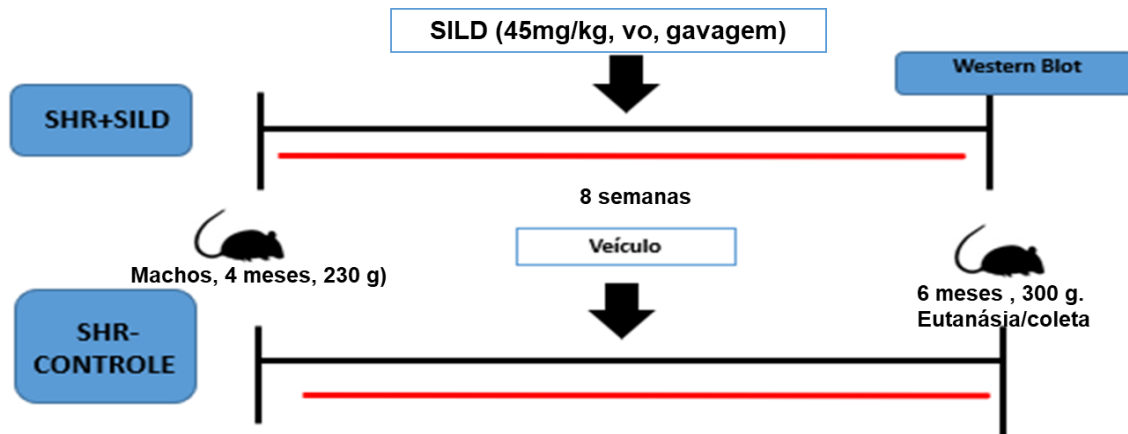


Fonte: o autor (2021).

4.3.4 Determinação de proteínas cardíacas por Western blot

Um subgrupo com 8 animais foi usado para esta análise. Após tratamento com Sildenafil, os ratos foram anestesiados com cetamina-xilazina, conforme descrito anteriormente, e eutanasiados por exanguinação. O coração e aorta foram coletados em solução de Krebs e mantidos em freezer a -80°C , até o momento das análises.

Figura 6. Desenho experimental (b). Subgrupo de animais tratados para determinação da expressão proteica por Western blot.



Fonte: o autor (2021).

A expressão proteica do tecido miocárdico foi avaliada através da técnica de western blot. Foram avaliadas as proteínas NCX-1, CASQ2, pTnI, SERCA2a e pCaMKII envolvidas na regulação do Ca^{2+} em cardiomiócitos. Para isso, os tecidos preservados em $-80^{\circ}C$ foram homogeneizados em solução tampão composta de: Tris (10 mM, pH= 7,4), Lauril sulfato de sódio (SDS, 1%) e Metavanadato de sódio (1 mM). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm à $0^{\circ}C$ e a concentração de proteína foi mensurada no sobrenadante, conforme descrito por BRADFORD (1976). As proteínas presentes no homogenato e o padrão de peso molecular foram separadas eletroforéticamente em gel de poliácridamida a 15% e 10% e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham Biosciences), usando um Mini Trans-Blot Cell system (Bio-Rad) e tampão de transferência, contendo: Tris 25mM; glicina 190mM; metanol 20% e SDS 0,05%. As membranas foram bloqueadas com uma solução de leite desnatado a 5% por 1h em temperatura ambiente e, posteriormente, incubadas durante à noite com o anticorpo primário para a proteína de interesse (CASQ2, NXC, pTnI, SERCA2a e pCaMKII). Após consecutivas lavagens com tampão TBS-T 0,1% as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos, conjugados com peroxidase (GE HealthCare, Little Chalfont-Buckinghamshire, UK). As bandas resolvidas foram digitalizadas usando um ChemiDoc MP System Software e quantificadas usando Image Lab Software, versão 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média \pm S.E.M. A significância estatística foi determinada pelo teste t de Student (quando dois grupos foram comparados) ou análise de variância a uma ou duas vias. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA.

6 RESULTADOS

6.1 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA POR PLETISMOGRAFIA

Após o período de adaptação dos animais ao sistema de pletismografia para evitar-se o viés estresse, no final dos tratamentos com Sildenafil ou veículo, foi realizada a média de 10 registros para cada animal, conforme descrito em material e métodos. Estes resultados são apresentados na tabela 1 em que pode ser observado que não houve diferenças da PAS entre os grupos controle e tratado.

6.2 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AVALIAÇÃO AUTONÔMICA

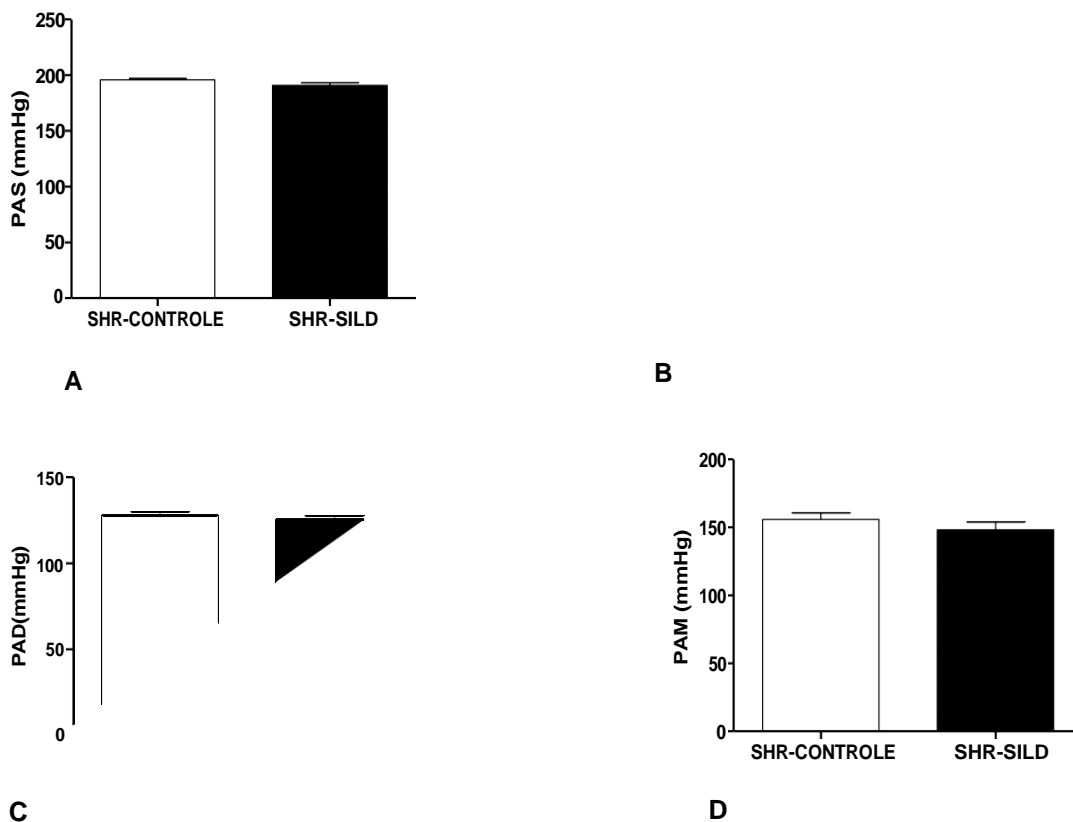
Em ratos acordados, foi mostrado que não há diferenças significativas entre os valores basais da PAS do grupo tratado com SILD ou com veículo. A PAD e PAM também foram semelhantes entre grupos (Figura 7, Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos parâmetros cardiovasculares e a avaliação autonômica de ratos tratados com Sildenafil (SILD) e tratados com veículo (CONTROLE). PAS* (Pressão arterial sistólica, por pletismografia), PAS (Pressão arterial sistólica, invasiva), PAD (Pressão artéria diastólica), (PAM) Pressão arterial media, FC (Frequência cardíaca), FCI (Frequência cardíaca intrínseca), T.S (tônus simpático). T.V (Tônus vagal). Os valores foram expressos como média \pm SEM; n=7 animais por grupo. $p > 0,05$; teste t de Student não pareado.

PARAMETRO	SHR CONTROLE	SHR -SILD
PAS*(mm Hg)	202,3 \pm 1,55	196,0 \pm 2,54
PAS (mmHg)	195,7 \pm 1,22	191,0 \pm 2,17
PAD (mmHg)	128,2 \pm 2,07	125,4 \pm 2,33
PAM (mmHg)	156,0 \pm 4,74	148,2 \pm 5,92
FC (bpm)	364,3 \pm 10,14	376,3 \pm 6,58
FCI (bpm)	393,1 \pm 14,02	391,3 \pm 12,01
T.S (bpm)	34,50 \pm 9,59	27,33 \pm 6,32
T.V (bpm)	27,83 \pm 3,49	28,17 \pm 3,53

Fonte: o autor (2021).

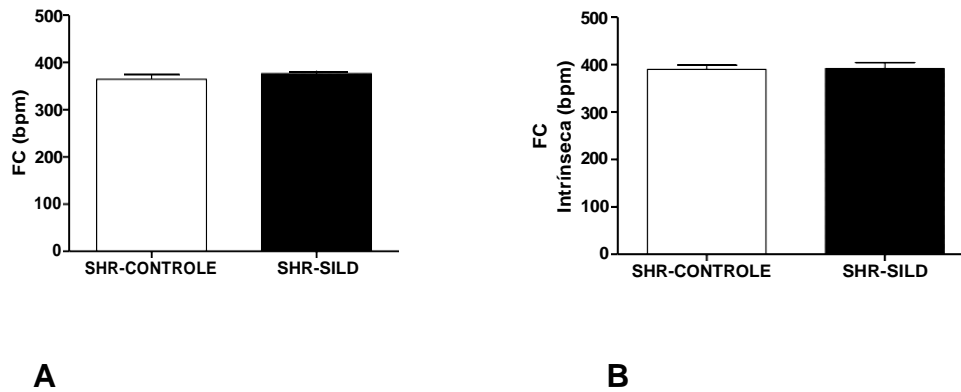
Figura 7. Efeito do Sildenafil (SILD) sobre a pressão arterial sistólica (PAS) (não invasiva: painel A, invasiva: painel B), pressão arterial diastólica (PAD) (painel C) e pressão arterial média (PAM) (painel D). em animais acordados. n= 7 ratos por grupo; Testet de Student não pareado; $p > 0,05$ Sildenafil vs. Controle.



Fonte: o autor (2021).

Nos níveis de FC, FCI e atividades simpática e vagal não foram achadas diferenças entre os grupos controle e tratado (Figura 8, Tabela 1).

Figura 8. Efeito do Sildenafil (SILD) sobre os valores de frequência cardíaca basal (FC) (painel A) e frequência cardíaca intrínseca (FCI) (painel B). Os valores são expressos como média \pm SEM. n = 7 ratos por grupo; Teste t de Student não pareado; $p > 0,05$ Sildenafil vs. Controle.

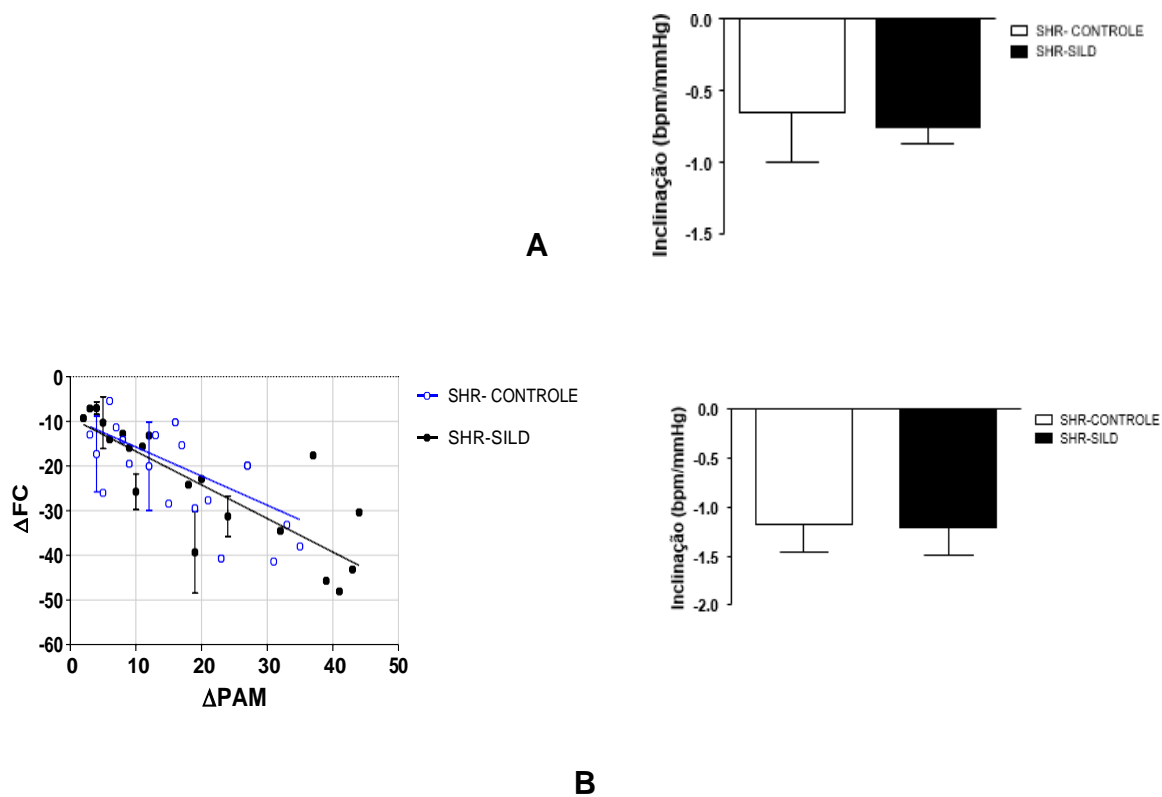


Fonte: o autor (2021).

6.3 TESTE DE SENSIBILIDADE BARORREFLEXA

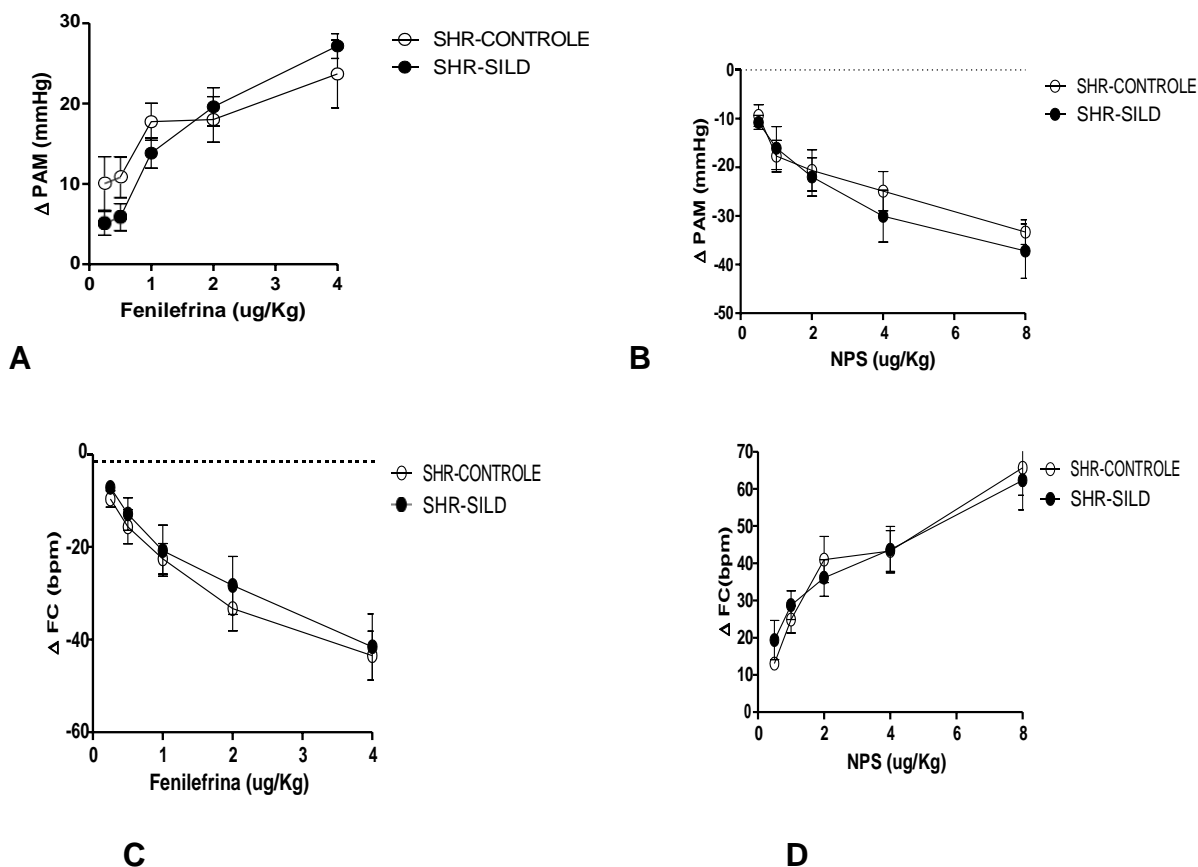
A administração intravenosa (I.V.), de doses crescentes de FEN e os consequentes efeitos pressores, evocaram a bradicardia reflexa esperada em ambos os grupos; a resposta taquicárdica foi observada com a administração de NPS. Como mostrado na (Figura 9.A), não houve diferença na resposta de sensibilidade do barorreflexo (inclinação da reta) entre o grupo controle e grupo tratado, quando desafiados por doses crescentes de FEN ($-0,65 \pm 0,34$ vs $-0,75 \pm 0,12$ b p m/mm Hg) respectivamente. Uma resposta similar foi vista no desafio à doses crescente de NPS ($-1,176 \pm 0,27$ vs $-1,204 \pm 0,29$ (bpm/mm Hg) entre o grupo controle e grupo tratado, respectivamente (Figura 9.B). Como consequência, o comportamento da PAM e da FC frente à administração de FEN e NPS (ponto a ponto) não mostrou diferenças entre grupos (Figura 10 A).

Figura 9. Efeito do Sildenafil (SILD) sobre a resposta barorreflexa frente à fenilefrina (FEN) e nitroprussiato de sódio (NPS) (painel A e B, respectivamente). Os valores foram expressos como média \pm S.E.M. n=7 ratos por grupo; $p > 0,05$; teste t de Student não pareado.



Fonte: o autor (2021).

Figura 10. Efeito do Sildenafil (SILD) na pressão arterial média e na frequência cardíaca diante da administração de doses crescentes de fenilefrina (FEN) e nitroprussiato de sódio (NPS) (painel A, B; e C, D, respectivamente). ANOVA a duas vias., $p > 0,05$



Fonte: o autor (2021).

6.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARDÍACAS

A análise de Western blot não mostrou diferença na expressão de CASQ2 NCX1, CASQ2, pTnl, SERCA2a e pCaMKII entre os grupos (Tabela 2).

Tabla 2. Comparação da expressão por Westerns blot., das proteínas cárdicas reguladoras do Ca^{2+} de ratos tratados com Sildenafil (SILD) e tratados com veículo (CONTROLE). CASQ2 (Calsequestreina 2), pTnI (Subunidade inibitória da troponina), NXC1 (Trocador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$), SERCA2a (Retículo sarcoplasmático Ca^{++} -ATPase), pCaMKII (Proteína quinase dependente de calmodulina II). Os valores foram expressos como média \pm SEM; n=4 animais por grupo. ANOVA a duas vias; $p > 0,05$. Teste t de Student não pareado.

PARAMETRO	SHR CONTROLE	SHR -SILD
CASQ2	0,42 \pm 0,01	0,65 \pm 0,07
pTnI	0,11 \pm 0,08	0,12 \pm 0,03
NXC1	0,33 \pm 0,04	0,52 \pm 0,07
SERCA2a	0,23 \pm 0,02	0,25 \pm 0,02
pCaMKII	0,19 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02

Fonte: o autor (2021).

7 DISCUSSÃO

O Sildenafil, um fármaco empregado inicialmente para o tratamento da disfunção erétil e posteriormente na HAP, tem despertado o interesse de pesquisadores quanto ao seu uso potencial como medicamento coadjuvante na terapia anti-hipertensiva. Seus efeitos terapêuticos são devido a inibição da enzima PDE5a, aumentando assim a vida média do GMPc e consequente ativação da PKG e de canais catiônicos, mediando processo fisiológicos especialmente a nível cardiovascular (contratilidade e remodelação cardíaca, tônus e remodelação vascular, entre outros (FIEDLER; WOLLERT, 2004; FRANCIS; BLOUNT; CORBIN, 2011; HOLTWICK et al., 2003; TAKIMOTO, 2012). Além da clássica ação do Sildenafil por meio da via GMPc/PKG, se tem demonstrado recentemente efeitos antioxidante e anti-inflamatório em nível vascular por meio da atenuação da expressão das enzimas COX-1 e COX-2, evitando oxidação e interferência da via GMPc / PKG (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019; LEAL et al., 2020).

No presente trabalho nós escolhemos o SHR, um modelo clássico para estudar a HA e as doenças cardiovasculares, associadas à cronicidade desta condição patológica (conforme descrito em seções anteriores), para verificar o possível efeito anti-hipertensivo do Sildenafil, uma vez que é bem determinado que esses animais apresentam um quadro hipertensivo aos 4 meses de idade. Portanto, essa foi a idade escolhida para o início do tratamento com Sildenafil sendo mantido por 2 meses. Aos 6 meses de idade, conforme observado nos nossos resultados, nem a PA nem a FC foram alteradas pelo tratamento com Sildenafil. Estes resultados corroboram os reportados previamente por nosso grupo de pesquisa (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019) e por KRISTEK, KOPRDOVÁ, CEBOVÁ, (2007). Entretanto, LEAL e colaboradores (2020) evidenciaram um efeito anti-hipertensivo que foi atribuído ao efeito antioxidante e protetor vascular desse fármaco. Curiosamente, TOBLLI e colaboradores (2007) encontraram uma redução de mais de 40 mm Hg da PAS em SHR tratados com 10mg/kg de Sildenafil durante 6 meses. Da mesma forma, YAGUAS e colaboradores (2010) mostraram uma redução de cerca de 25 mmHg. Tais discrepâncias poderiam ser explicadas pela maior duração do tratamento, que foi mantido até os 9 meses de idade. SHR são conhecidos

pela acentuação dos distúrbios cardiovasculares após os 6 meses de idade. Em linha com este raciocínio, KAPUR e colaboradores (2010) evidenciaram aumento na duração e amplitude das correntes do Ca^{2+} basal em cardiomiócitos, o que ocorreu paralelamente ao envelhecimento (7,5 meses) e ao desenvolvimento de IC; quadro que melhorou com o uso de Sildenafil até os 9 meses de idade. Assim, pode-se inferir que os efeitos benéficos, em nível cardiovascular, da inibição da PDE5a poderiam ser melhor evidenciados nessa faixa etária.

O efeito anti-hipertensivo do Sildenafil também foi documentado em SHR com síndrome metabólica (DOGHRI et al., 2019) e em outros modelos de doença cardiovascular hipertensiva. Assim, FERREIRA-MELO e colaboradores (2006) e (ROSSONI et al., 2007) demonstraram que ratos Wistar com hipertensão induzida por L-NAME, apresentaram uma diminuição da PA quando tratados com Sildenafil. No entanto, em Wistar submetidos a isquemia/reperfusão miocárdica (MI/R), o tratamento crônico com Sildenafil não reduziu os níveis pressóricos (PÉREZ et al., 2007). Diante disso, pode-se inferir que o efeito anti-hipertensivo do fármaco é mais palpável quando usado em modelo animal com hipertensão pré-estabelecida e com comprometimento vascular, como ocorre na síndrome metabólica e na inibição da síntese de NO; possivelmente devido a conhecida melhora na função endotelial do Sildenafil (CAVALCANTI et al., 2016).

A modulação autonômica da função cardiovascular está comprometida na HA em humanos. Em SHR, há um sustentado tônus simpático, ativação do SRAA e função barorreflexa alterada, o que caracteriza esse modelo de hipertensão; fato que contribui para a perpetuação da doença (LAWLER et al., 1991). Estudos em modelos murinos têm reportado que o Sildenafil possui um efeito cardioprotetor pela modulação da resposta miocárdica durante a estimulação simpática crônica via “cross-talk”, mediada por PDE5 –PDE2 (ISIDORI et al., 2015) e pela fosforilação de TnI dependente de PKG (LEE et al., 2010). Em humanos, BORLAUG e colaboradores (2005) observaram que o Sildenafil embota as respostas sistólicas à estimulação β -adrenérgica pela dobutamina. Nós estudamos a atividade autonômica em SHR registrando a FC, a FCI e a atividade autonômica cardíaca (TS e TV), mas não encontramos diferenças significativas entre o

grupo tratado com Sildenafil e o controle. Dados prévios de nosso grupo de pesquisa mostraram que a inibição da PDE5a por Sildenafil, em preparações de coração isolado, atenua a resposta β -adrenérgica em concentrações crescentes de isoproterenol (TEIXEIRA-DA-SILVA, 2019), o que sugere possível efeito cardioprotetor, corroborado pela diminuição da produção de EROs e pelo aumento da atividade de superóxido dismutase (SOD). Por outro lado, em modelo de hipertensão 2 rins-1 clipe (2K1C) o tratamento com Sildenafil melhorou a sensibilidade do barorreflexo, a qual retornou aos níveis de animais não hipertensos (CAVALCANTI et al., 2016) Estas discrepâncias em relação a nossos resultados, poderiam ser atribuídas as particularidades dos modelos animais utilizado nos estudos, devido ao bem estabelecido desequilíbrio autonômico dos SHRs desde a fase pré-hipertensiva, comprometendo o funcionamento do componente efector simpático (SHANKS et al., 2013) o que contrasta com as alterações agudas presentes em ratos renovasculares. Também, é possível que os mecanismos pelos quais são instalados esses dois modelos de hipertensão ativem vias moleculares diferentes.

A atividade barorreflexa foi avaliada em nosso estudo, uma vez que é conhecido que os barorreceptores atuam como reguladores da PA. No entanto, sua sensibilidade encontra-se prejudicada na HA, pois alterações sustentadas dos valores pressóricos deslocam a faixa de funcionamento destes para o novo nível de PA, que passa a ser reconhecido como normal (SALGADO et al., 2007; CARVALHO-GALVÃO et al., 2018). Também se sabe que na ICC, a Ang II e o AT1R são super expressos no gânglio nodoso o que contribui para sua disfunção por superprodução de superóxido mitocondrial e diminuição da expressão de canais de Na^+ (Nav), embotando a sensibilidade do barorreceptor (ZHANG; MUELLEMAN; LI, 2015). Em nosso estudo, a atividade barorreflexa foi calculada como a derivação de FC em função da variação da PAM ($\Delta\text{HR} / \Delta\text{MAP}$), não sendo alterada pelo tratamento com Sildenafil o que foi demonstrado pela inclinação da reta. Ao nosso conhecimento, não há outros estudos que tenham verificado o efeito do Sildenafil sobre o barorreflexo em SHRs, no entanto, é sabido que SHRs perdem essa sensibilidade à medida que envelhecem, conforme ratificado em pesquisas de VALENTI e colaboradores (2009b) e CISTERNAS e colaboradores (2010) onde foi encontrado redução da função barorreflexa em resposta à fenilefrina quando comparados ao controle WYK. Interessantemente, CAVALCANTI e colaboradores (2016)

evidenciaram que em ratos 2K1C tratados com Sildenafil há uma melhora no controle barorreflexo da FC. Essa discrepância poderia ser atribuída ao modelo animal utilizado, como comentado anteriormente. É importante salientar que as doses empregadas no modelo 2K1C foram maiores (FEN: 8µg / Kg; NPS: 25µg / Kg) do que as usadas em nosso estudo.

Desequilíbrios progressivos na expressão e/ou atividade de fatores pro e antiapoptóticos cardíacos, assim como de proteínas encarregadas da regulação do Ca^{2+} são vinculadas às alterações cardíacas na HA. No caso de SHR, eles progridem de hipertensão persistente (cerca de 2 meses de idade) para hipertrofia compensada estável (cerca de 6 meses de idade) e posteriormente disfunção cardíaca e IC (cerca de 18 meses de idade) (DONG et al., 2012). Em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa, em que foi usado SHR de 6 meses de idade, tratados com Sildenafil durante 60 dias, foi observado uma redução significativa da área dos cardiomiócitos, sugerindo um efeito anti-hipertrófico e de proteção contra remodelação cardíaca. Isto foi demonstrado pela diminuição na expressão das proteínas de marcadores de hipertrofia cardíaca (β -MHC, GATA4 e NFATc3), assim como pela redução dos níveis de proteína TGF β , e maior expressão do peptídeo natriurético ventricular; eventos estes relacionados à cardioproteção (TEIXEIRA-DA-SILVA, 2019). Ao estudarmos a possível participação das proteínas NCX-1, CASQ2, pTnI, SERCA2a e pCaMKII envolvidas na regulação do Ca^{2+} e na contratilidade cardíaca, esperávamos encontrar diferenças, que efetivamente não ocorreram, de acordo com nossos resultados.

Poucos são os trabalhos na literatura que abordam o comportamento das proteínas reguladoras da dinâmica cardíaca do Ca^{2+} em SHR, e ainda mais escassos os que abordam o efeito do Sildenafil na modulação destas. BOKNÍK e colaboradores (2001) avaliaram a expressão da TnI, mas não encontraram diferenças na sua entre SHR e WKY. Em relação à forma fosforilada (ativa) da TnI, evento que ocorre por proteínas quinases (PKA, PKC), acelerando o relaxamento cardíaco (BOKNÍK et al., 2001; JIDEAMA et al., 1996), aumentos significativos são vistos no miocárdio de SHR entre os 15- 25 meses de idade que desenvolveram IC, quando comparados a WYK normotensos da mesma idade (DONG et al., 2012). Por outro lado, (BOND, 1997) observou maior

fosforilação de TnI, dependente de PKA, no SHR após a estimulação β -adrenérgica. Fato este que, segundo os autores, poderia contribuir para a diminuição da resposta inotrópica à estimulação β -adrenérgica. Neste contexto, foi mostrado em cardiomiócitos de camundongos normais e knockout para β_3 -adrenoceptores (β_3 -AR^{-/-}), *in vitro*, que a modulação contrátil por Sildenafil (1 μ M) exigiu a ativação de PKG e aumentou a fosforilação de TnI, como fatores primários subjacentes à capacidade de inibição aguda de PDE5a para atenuar a estimulação β -adrenérgica do miocárdio (LEE et al., 2010).

Em relação ao trocador NCX1, em nosso estudo o tratamento com Sildenafil não alterou a expressão desta proteína. Nesse panorama, e na ausência de estudos que permitam comparar esses achados, não é possível estabelecer uma relação entre a inibição de PDE5a e a expressão cardíaca de NCX1. Sabe-se que alterações do NCX1 levam à diminuição da contratilidade de miócitos, redução da remoção intracelular de Ca^{2+} e duração prolongada do ciclo cardíaco, sendo essas, características próprias da insuficiência ventricular em estágio terminal (HOUSER et al., 2000; LI et al., 2016). Nesse contexto de IC, é visto que o aumento na expressão e função do NCX1 poderia ter uma função antagônica a SERCA2a durante o relaxamento, removendo mais Ca^{2+} do citosol e evitando que o RS seja totalmente recarregado (REYES-JUÁREZ; ZARAIN-HERZBERG, 2006). Entretanto, PLUTEANU e colaboradores (2018) não encontraram diferenças significativas na expressão de NCX1 entre SHR com IC ou sem esta condição. Mas essa diferença foi vista em relação aos controles WKY, o que sugere que a contribuição desse trocador para a remoção global de Ca^{2+} não é influenciada pela IC.

Em nosso estudo, não achamos mudanças na expressão de CASQ2 pela inibição crônica de PDE5A. Porém, REYES-JUÁREZ; ZARAIN-HERZBERG (2006) afirmam que a expressão ou atividade da proteína parece não ter mudanças na hipertrofia nem na IC. Outros estudos, no entanto, mostram a expressão reduzida dessa proteína no miocárdio de SHRs entre os 15 - 25 meses de idade com IC, quando comparados com WYK normotensos da mesma idade (PLUTEANU et al., 2018). Em contraste com esses resultados, JONES e colaboradores (1998) mostraram que camundongos transgênicos com superexpressão de CASQ2 geraram hipertrofia cardíaca, embora que os autores indicassem a possibilidade de outros eventos moleculares, desencadeados no interior do

RS envolvendo proteínas reguladoras do Ca^{2+} , contribuirão para hipertrofia. Esses dados conflitantes sugerem que CASQ2 pode ter um papel que ainda não foi determinado no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

Por outro lado, embora o aumento na expressão de SERCA2a esteja associado a cardioproteção (CHENG et al., 2011) em nosso estudo não encontramos diferenças na expressão dessa proteína.

Em diversos modelos murinos de doença cardiovascular, o Sildenafil tem demonstrado restaurar expressão gênica e proteica da SERCA2a, diminuindo o estresse do RS, com melhora na manipulação do cálcio (NAGAYAMA et al., 2009; CHENG et al., 2011; GONG et al., 2013). Ao nosso conhecimento, não há outros estudos que tenham verificado o efeito do Sildenafil sobre a expressão de SERCA2a em SHRs, fato que limita nossa discussão sobre isso.

Por último, sobre a expressão da forma fosforilada de CaMKII, diferenças entre grupos não foram achadas em nossos estudos. CaMKII tem sido implicado na regulação do acoplamento excitação-contração cardíaca (ECC), bem como na sinalização apoptótica e remodelação adversa (VILA-PETROFF et al., 2007). Sabe-se que sua atividade se encontra aumentada em fibrilação atrial em humanos (VOIGT et al., 2012) e em ventrículos de SHRs (BOKNÍK et al., 2001), o que foi correlacionado com um aumento na fosforilação de PLB e maior captação de Ca^{2+} pelo RS. O Sildenafil tem mostrado efeito anti-hipertrofico em camundongos submetido a TAC, mediante a supressão da fosforilação de CaMKII, (HSU et al., 2009). Em contraste com esses resultados, ESKESEN e colaboradores (2015) em um modelo experimental de regurgitação aórtica com ratos, mostram que o Sildenafil não afetou os níveis fosforilados de CaMKII na atenuação do remodelo e disfunção cardíaca. Não foram encontrados estudos envolvendo a expressão e / ou fosforilação dessa proteína em SHRs, tratados com Sildenafil, o que nos permite-se contrastar com os nossos resultados.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo em relação ao efeito do Sildenafil nos parâmetros cardiovasculares são consistentes com outros estudos em SHR tratados com Sildenafil na mesma faixa etária (4- 6 meses). No que diz respeito ao papel do Sildenafil na modulação da via do Ca^{2+} em SHRs, os resultados não são conclusivos, precisando-

se de mais estudos que envolvam o uso do fármaco em estágios mais avançados de desenvolvimento da doença cardíaca. Os mesmos, devem se aprofundar na análise de outras proteínas e marcadores de hipertrofia cardíaca, o que ajudaria a nossa compreensão da fisiopatologia da cardiomiopatia hipertensiva, bem como no esclarecimento do potencial terapêutico da inibição da PDE5a visando estudos clínicos onde o fármaco possa ser usado como adjuvante na terapia anti-hipertensiva.

8 CONCLUSÃO

O uso crônico de Sildenafil (45 mg/kg) em ratos espontaneamente hipertensos não reduziu a pressão arterial, nem melhorou a sensibilidade barorreflexa, quando utilizado a partir dos 4 meses até os 6 meses de idade. Ainda foi observado que não alterou a expressão das proteínas reguladoras do Ca^{+2} calsequestrina 2 (CAQS2), o trocador $\text{Na}^{+} / \text{Ca}^{+}$ (NXC1), a retículo sarcoplasmático Ca^{+2} -ATPase (SERCA2a), e a forma fosforilada da proteína quinase dependente de calmodulina II (pCAMKII) nem a subunidade inibitória da troponina (pTnl) no tecido cardíaco. Esses achados devem ser interpretados dentro do contexto e limitações próprias de nosso trabalho, uma vez que seria esclarecedor o estudo de outras proteínas e fatores reguladores do Ca^{+2} no cardiomiócito, tais como o canal para o Ca^{+2} de tipo- I, receptor de rianodina 2 (RyR2), calcineurina (CN), fosfolambano (PLB), o que permitiria uma visão mais ampla do efeito da inibição da PDE5a sobre a via do Ca^{+2} em SHRs.

REFERÊNCIAS

- AFANAS'EV, I. ROS and RNS signaling in heart disorders: Could antioxidant treatment be successful? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2011, 2011.
- AHMEDA, A. F.; ALZOGHAIBI, M. Factors regulating the renal circulation in spontaneously hypertensive rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 4, p. 441–451, 2016.
- ÁLVAREZ, M. C. et al. Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? **Hypertension Research**, v. 31, n. 7, p. 1465–1476, 2008.
- ANDERSSON, K. E. PDE5 inhibitors – pharmacology and clinical applications 20 years after Sildenafil discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 13, p. 2554–2565, 2018.
- AOYAGI, T.; KOSHIMIZU, T. A.; TANOUE, A. Vasopressin regulation of blood pressure and volume: Findings from V1a receptor-deficient mice. **Kidney International**, v. 76, n. 10, p. 1035–1039, 2009.
- BEEVERS, G.; LIP, G. Y. H.; BRIEN, E. O. Pathophysiology of hypertension Cardiac output and peripheral resistance Renin-angiotensin system Autonomic nervous system. **Journal of Hypertension**, v. 322, n. April, p. 912–916, 2001.
- BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488–520, 2006.
- BERNARDO, B. C. et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 128, n. 1, p. 191–227, 2010.
- BERS, D. M.; GUO, T. Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1047, p. 86–98, 2005.
- BOKNÍK, P. et al. Enhanced protein phosphorylation in hypertensive hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 51, n. 4, p. 717–728, 2001.
- BOND, M. TVoportun i phosphorylation in spontaneously hypertensive rat heart: Effect of B-adrenergic stimulation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 42, n. 3, 1997.
- BORLAUG, B. A. et al. Sildenafil inhibits β -adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2642–2649, 2005.
- BRADFORD, M.A. Fast and sensitive method for quantifying amounts of micrograms of protein using the principle of protein and dye binding. **Analytical biochemistry**, vol. 72, not 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRIONES, A. M.; TOUYZ, R. M. Oxidative stress and hypertension: Current concepts.

Current Hypertension Reports, v. 12, n. 2, p. 135–142, 2010.

BROOK, R. D.; JULIUS, S. Autonomic Imbalance, Hypertension, and Cardiovascular Risk. p. 112–122, 2000.

BROOKSBY, P.; LEVI, A. J.; JONES, J. V. Investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. **Cardiovascular Research**, v. 27, n. 7, p. 1268–1277, 1993.

BRUM, P. C. et al. Exercise Training Increases Baroreceptor Gain Sensitivity in Normal and Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018–1022, 2000.

CALDERÓN-CORTÉS, E. et al. Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age. **Mitochondrion**, v. 8, n. 3, p. 262–272, 2008.

CAMPAGNARO, B. P. et al. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. **International Journal of Hypertension**, v. 2012, 2012.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. v. 8, n. 1, p. 30–40, 2001.

CARNEIRO-JÚNIOR, M. A. et al. Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 11, p. 960–965, 2014.

CARRETERO, O. A.; OPARIL, S. Essential hypertension: part I: definition and etiology. **Circulation**, 101.3: 329-335, 2000.

CARVALHO-GALVÃO, A. et al. A newly isolated carboxymethyl-glucan (CM-G) restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–8, 2018.

CAVALCANTI, C. DE O. et al. Inhibition of PDE5 restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–9, 2016.

CAWLEY, S. M. et al. Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 5, p. 1023–1033, 2007.

CHEN-IZU, Y. et al. Hypertension-induced remodeling of cardiac excitation-contraction coupling in ventricular myocytes occurs prior to hypertrophy development. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 6, p. 3301–3310, 2007.

CHENG, Y. S. et al. Sildenafil and FDP-Sr attenuate diabetic cardiomyopathy by suppressing abnormal expression of myocardial CASQ2, FKBP12.6, and SERCA2a in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 4, p. 441–448, 2011.

- CISTERNAS, J. R. et al. Cardiac baroreflex is already blunted in eight weeks old spontaneously hypertensive rats. **International Archives of Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2010.
- CONRAD, C. H. et al. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. **Circulation**, v. 91, n. 1, p. 161–170, 1995.
- DAS, A. et al. ERK phosphorylation mediates Sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 5, p. 1236–1243, 2009.
- DAS, A.; XI, L.; KUKREJA, R. C. Protein kinase G-dependent cardioprotective mechanism of phosphodiesterase-5 inhibition involves phosphorylation of ERK and GSK3 β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 29572–29585, 2008.
- DE QUEIROZ, T. M.; MONTEIRO, M. M. O.; BRAGA, V. A. Angiotensin-II-derived reactive oxygen species on baroreflex sensitivity during hypertension: New perspectives. **Frontiers in Physiology**, v. 4 MAY, n. May, p. 1–7, 2013.
- DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M. A. Biochemistry of soluble guanylate cyclase. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 191, p. 17–31, 2009.
- DOGHRI, Y. et al. Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–17, 2019.
- DONG, X. et al. Augmented phosphorylation of cardiac troponin I in hypertensive heart failure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 848–857, 2012.
- DUPONT, S. et al. The onset of left ventricular diastolic dysfunction in SHR rats is not related to hypertrophy or hypertension. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 302, n. 7, p. 1524–1532, 2012.
- ELMES, M. J. et al. Sex differences in sensitivity to β -adrenergic agonist isoproterenol in the isolated adult rat heart following prenatal protein restriction. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 5, p. 725–734, 2009.
- EMILIO, L. **Barorreflejo en la hipertensión arterial: Bases de la anatomofuncionales y aplicacion clinica.[Tesis]**. [s.l: s.n.].
- ESKESEN, K. et al. Sildenafil treatment attenuates ventricular remodeling in an experimental model of aortic regurgitation. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, 2015.
- FARAH, V. M. A. et al. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 3, p. 361–369, 1999.
- FERREIRA-MELO, S. E. et al. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 542, n. 1–3, p. 141–147, 2006.
- FIEDLER, B.; WOLLERT, K. C. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca²⁺-calcineurin-NFAT cascade in cardiac myocytes.

Cardiovascular Research, v. 63, n. 3, p. 450–457, 2004.

FISHER, J. P.; PATON, J. F. R. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: Implications for hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 26, n. 8, p. 463–475, 2012.

FLEMING, I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 793–806, 2010.

FLOREA, V. G.; COHN, J. N. The autonomic nervous system and heart failure. **Circulation Research**, v. 114, n. 11, p. 1815–1826, 2014.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 651–690, 2011.

FRANK, K.; KRANIAS, E. G. Phospholamban and cardiac contractility. **Annals of Medicine**, v. 32, n. 8, p. 572–578, 2000.

Garcia, J. A. D., & Incerpi, E. K. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do óxido nítrico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 90, 443-450, 2008

GALIE, N. et al., Sildenafil use in pulmonary arterial hypertension (SUPER) Study Group. **The New England Journal of Medicine**. 17;353(20):2148-57,2005.

GAO, X. Y. et al. AT1 receptor in rostral ventrolateral medulla mediating blunted baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 11, p. 1433–1438, 2004.

GERLACH, D. A. et al. Novel Approach to Elucidate Human Baroreflex Regulation at the Brainstem Level: Pharmacological Testing During fMRI. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 1–10, 2019.

GOLDSTEIN, I. et al. Oral Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. **The New England Journal of Medicine** 338(20):1397-404, 1998.

GOMEZ-ALAMILLO, C. et al. Interactions Between Vasoconstrictors and Vasodilators in Regulating Hemodynamics of Distinct Vascular Beds. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 831–836, 2003.

GONG, W. et al. Chronic inhibition of cGMP-specific phosphodiesterase 5 suppresses endoplasmic reticulum stress in heart failure. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 7, p. 1396–1409, 2013.

GU, Q. et al. Gender differences in hypertension treatment, drug utilization patterns, and blood pressure control among US adults with hypertension: Data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 7, p. 789–798, 2008.

GUNTER, T. E. et al. Calcium and mitochondria. **FEBS Letters**, v. 567, n. 1, p. 96–102, 2004.

- GUR, S. et al. PDE5 Inhibitor Treatment Options for Urologic and Non-Urologic Indications: 2012 Update. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 34, p. 5590–5606, 2012.
- HEAD, G. A.; ADAMS, M. A. Characterization of the Baroreceptor Heart Rate Reflex During Development in Spontaneously Hypertensive Rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 8, p. 587–597, 1992.
- HOLTWICK, R. et al. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1399–1407, 2003.
- HOUSER, S. R. et al. Functional properties of failing human ventricular myocytes. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 101–107, 2000.
- HSU, S. et al. Phosphodiesterase 5 inhibition blocks pressure overload-induced cardiac hypertrophy independent of the calcineurin pathway. **Cardiovascular Research**, v. 81, n. 2, p. 301–309, 2009.
- HUTCHINGS, D. et al. Effects of phosphodiesterase-5 inhibition with Sildenafil on calcium waves in cardiac myocytes. **The Lancet**, v. 389, p. S50, 2017.
- IRIGOYEN, M. C. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 9, p. 1213–1220, 1998.
- IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular_ regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático_IRIGOYEN 2001. v. 8, n. 1, p. 55–62, 2001.
- ISIDORI, A. M. et al. Inhibition of type 5 phosphodiesterase counteracts β 2-adrenergic signalling in beating cardiomyocytes. **Cardiovascular Research**, v. 106, n. 3, p. 408–420, 2015.
- JESKE, I. et al. Identification of baroreceptor reflex interneurons in the caudal ventrolateral medulla. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 1 33-1, 1993.
- JACKSON, E.K. Vasopressin and other agents affecting the renal conservation of water. **Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics**, 1996
- JIDEAMA, N. M. et al. Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 38, p. 23277–23283, 1996.
- JONES, L. R. et al. Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 7, p. 1385–1393, 1998.

- JUDY, W. V.; FARRELL, S. K. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 1, n. 6, p. 605–614, 1979.
- KÄHLER, C. M.; COLLESELLI, D. Pulmonary arterial hypertension (PAH) in connective tissue diseases. **Rheumatology**, v. 45, n. SUPPL. 3, p. 13–15, 2006.
- KALRA, P. R. et al. Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure. **Circulation**, v. 107, n. 4, p. 571–573, 2003.
- KAPUR, S. et al. Early development of intracellular calcium cycling defects in intact hearts of spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, n. 6, 2010.
- KAWADA, T. et al. Dynamic characteristics of baroreflex neural and peripheral arcs are preserved in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 1, p. 155–165, 2011.
- KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: Benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1288–1305, 2012.
- KOLETTIS, T. M. et al. Dose-dependent effects of Sildenafil on post-ischaemic left ventricular function in the rat isolated heart. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 3, p. 346–351, mar. 2010.
- KRISTEK, F.; KOPRDOVÁ, R.; CEBOVÁ, M. Long-term effects of early administered Sildenafil and NO donor on the cardiovascular system of SHR. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 33–43, 2007.
- KUKREJA, R. C.; SALLOUM, F. N.; DAS, A. Cyclic guanosine monophosphate signaling and phosphodiesterase-5 inhibitors in cardioprotection. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 59, n. 22, p. 1921–1927, 2012.
- KWAN, H. Y.; et al. Role of cyclic nucleotides in the control of cytosolic Ca²⁺ levels in vascular endothelial cells. **Clinical and Experimental Pharmacology, Physiology**, Oxford, v. 36, p. 857-866, 2009.
- LA ROVERE, M. T. et al. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in the identification of patients at risk for life-threatening arrhythmias: Implications for clinical trials. **Circulation**, v. 103, n. 16, p. 2072–2077, 2001.
- LÁBROVÁ, R. et al. Age-dependent relationship between the carotid intima-media thickness, baroreflex sensitivity, and the inter-beat interval in normotensive and hypertensive subjects. **Physiological Research**, v. 54, n. 6, p. 593–600, 2005.
- LAWLER, J. E. et al. Baroreflex function in chronically stressed borderline hypertensive rats. **Physiology and Behavior**, v. 49, n. 3, p. 539–542, 1991.
- LAYLAND, J.; SOLARO, R. J.; SHAH, A. M. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. **Cardiovascular Research**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2005.

- LEAL, M. A. S. et al. Sildenafil (Viagra®) Prevents Cox-1/ TXA2 Pathway-Mediated Vascular Hypercontractility in ApoE^{-/-} Mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1796–1809, 2018.
- LEAL, M. A. S. et al. Sildenafil reduces aortic endothelial dysfunction and structural damage in spontaneously hypertensive rats: Role of NO, NADPH and COX-1 pathways. **Vascular Pharmacology**, v. 124, n. November, 2020.
- LEE, D. I. et al. PDE5A suppression of acute β -adrenergic activation requires modulation of myocyte beta-3 signaling coupled to PKG-mediated troponin i phosphorylation. **Basic Research in Cardiology**, v. 105, n. 3, p. 337–347, 2010.
- LERMAN, L. O. et al. Animal models of hypertension: An overview. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 146, n. 3, p. 160–173, 2005.
- LI, J. M. et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension**, v. 40, n. 4, p. 477–484, 2002.
- LI, Y. et al. Camkii-dependent phosphorylation regulates basal cardiac pacemaker function via modulation of local ca^{2+} releases. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 311, n. 3, p. H532–H544, 2016.
- LIMAS, C.; WESTRUM, B.; LIMAS, C. J. The evolution of vascular changes in the spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Pathology**, v. 98, n. 2, p. 357–383, 1980.
- LIN, C.-H. et al. Baroreceptor Sensitivity Predicts Functional Outcome and Complications after Acute Ischemic Stroke. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 3, p. 300, 2019.
- LOCATELLI, J.; DE ASSIS, L. V. M.; ISOLDI, M. C. Calcium handling proteins: Structure, function, and modulation by exercise. **Heart Failure Reviews**, v. 19, n. 2, p. 207–225, 2014.
- LU, Z. et al. Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. **Circulation**, v. 121, n. 13, p. 1474–1483, 2010.
- MADHANI, M. et al. Phospholemman Ser69 phosphorylation contributes to Sildenafil-induced cardioprotection against reperfusion injury. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 299, n. 3, p. H827-36, set. 2010.
- MANCIA, G.; GRASSI, G. The autonomic nervous system and hypertension. **Circulation Research**, v. 114, n. 11, p. 1804–1814, 2014.
- MARTINS, C.S. Troponina: estrutura, fisiopatologia e importância clínica para além da isquemia miocárdica. **Arquivos de Medicina**, 23.6: 221-240, 2009.
- MARKMAN FILHO, B. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial-2020 Barroso et al. Arq Bras Cardiol. **Arquivos Brasileiros de Cardilologia**, v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021.
- MARKS, A. R. et al. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 86, n. 22, p. 8683–8687, 1989.

MARKS, A. R. Calcium and the heart: A question of life and death. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 5, p. 597–600, 2003.

MAULIK, S. K.; KUMAR, S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: A review. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 22, n. 5, p. 359–366, 2012.

MAURICE, D. H. et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 4, p. 290–314, 2014.

MENÉNDEZ, J.T; MOSQUERA, E. La función de bomba del corazón: el ciclo cardíaco. In: **Fisiología humana**. McGraw-Hill Interamericana de España, 2006. p. 485-506.

MIKI, K.; YOSHIMOTO, M. Exercise-induced modulation of baroreflex control of sympathetic nerve activity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. JUL, p. 1–6, 2018.

MOLKENTIN, J. D. Dichotomy of Ca²⁺ in the heart: Contraction versus intracellular signaling. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 3, p. 623–626, 2006.

MOLKENTIN, J. D; DORN, G.W. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. **Annual Review of Physiology**, 63:391–426, 2001.

MURPHY, T. J. et al. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, v. 351, n. 6323, p. 233–236, 1991.

MUTLAK, M.; KEHAT, I. Extracellular signal-regulated kinases 1/2 as regulators of cardiac hypertrophy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. JUL, p. 1–8, 2015.

MUZAFFAR, S. et al. Sildenafil citrate and Sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91 phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 1, p. 109–117, 2005.

NAGAYAMA, T. et al. 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. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 2, p. 207–215, 2009.

NAKAMURA, M.; SADOSHIMA, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 7, p. 387–407, 2018.

NETO, O. B. et al. Exercise training improves hypertension-induced autonomic dysfunction without influencing properties of peripheral cardiac vagus nerve. **Autonomic Neuroscience**, v. 208, p. 66–72, dez. 2017.

NGUYEN DINH CAT, A.; TOUYZ, R. M. A new look at the renin-angiotensin system - Focusing on the vascular system. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 2141–2150, 2011.

NOVÁK, P.; SOUKUP, T. Calcineurin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones. **Physiological Research**, v. 60, n. 3, p. 439–452, 2011.

- ODA, T. et al. Nuclear translocation of calmodulin in pathological cardiac hypertrophy originates from ryanodine receptor bound calmodulin. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 125, p. 87–97, 2018.
- OKAMOTO, K; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, 27.3: 282-293, 1963.
- OPARIL, S.; AMIN ZAMAN, ; ; M; CALHOUN, D. A. Pathogenesis of Hypertension Clinical Principles Physiologic Principles. **Ann Intern Med**, v. 139, p. 761–776, 2003.
- PARDO, A. C.; RINALDI, G. J.; MOSCA, S. M. Mitochondrial calcium handling in normotensive and spontaneously hypertensive rats: Correlation with systolic blood pressure levels. **Mitochondrion**, v. 20, n. 85, p. 75–81, 2015.
- PÉREZ, N. G. et al. Phosphodiesterase 5A inhibition induces Na⁺/H⁺ exchanger blockade and protection against myocardial infarction. **Hypertension**, v. 49, n. 5, p. 1095–1103, 2007.
- PIZZORNO, J.A; RIVERO M. I, PERNA, E.R. Reflejos cardíacos y arteriales. Barorreceptores, capítulo 1. **Hipertensión arterial, anatomía, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica**. SAHA.
- PLAČKIĆ, J. et al. Enhanced nucleoplasmic Ca²⁺ signaling in ventricular myocytes from young hypertensive rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 101, p. 58–68, 2016.
- PLUTEANU, F. et al. Progressive impairment of atrial myocyte function during left ventricular hypertrophy and heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 114, n. November 2017, p. 253–263, 2018.
- POULTER, N. R.; PRABHAKARAN, D.; CAULFIELD, M. Hypertension. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 801–812, 2015.
- PRONIN, A. N. et al. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18273–18280, 1997.
- RAHATE, K.; BHATT, L. K.; PRABHAVALKAR, K. S. SERCA stimulation: A potential approach in therapeutics. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 95, n. 1, p. 5–15, 2020.
- RAO, A.; LUO, C.; HOGAN, P. G. Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 707–747, 1997.
- REYES-JUÁREZ, J. L.; ZARAIN-HERZBERG, Á. Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. **Archivos de Cardiología de México**, v. 76, n. SUPPL. 4, p. 18–32, 2006.
- RIVERO VILCHES, F. et al. Guanilato ciclasas: procesos fisiológicos mediados por GMPc. **Nefrología (Madr.)**, v. XXI, p. 233–239, 2001.
- ROSSONI, G. et al. Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia-reperfusion damage in the rat. **British Journal of**

Pharmacology, v. 150, n. 5, p. 567–576, 2007.

RUBIO-GUERRA, A. F. New guides of American College of Cardiology/American Heart Association Hypertension for the treatment of high blood pressure. A jump in the right direction? **Medicina Interna de Mexico**, v. 34, n. 2, p. 299–303, 2018.

RUEDA, A.; DE ALBA-AGUAYO, D. R.; VALDIVIA, H. H. Receptor de rianodina, fuga de calcio y arritmias. **Archivos de Cardiología de México**, v. 84, n. 3, p. 191–201, 2014.

SALGADO, H. C. et al. Baroreflex responses to electrical stimulation of aortic depressor nerve in conscious SHR. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 1, p. 593–600, 2007.

SALLOUM, F. N. et al. Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice. **AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY**, v. 294, n. 3, p. H1398–H1406, mar. 2008.

SAPIA, L. Disección de los mecanismos subcelulares responsables del fenómeno de la escalera negativa y la apoptosis en la insuficiencia cardíaca usando un modelo celular. 2009, **Tese** (Doctorado en Ciencias Biológicas) - Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2009.

SCHULZ, R. A.; YUTZEY, K. E. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. **Developmental Biology**, v. 266, n. 1, p. 1–16, 2004.

SCHWARTZ, B. G. et al. The endothelial cell in health and disease: its function, dysfunction, measurement and therapy. **International Journal of Impotence Research**, v. 22, n. 2, p. 77–90, 2010.

SCHWARTZ, B. G. et al. Phosphodiesterase type 5 inhibitors improve endothelial function and may benefit cardiovascular conditions. **American Journal of Medicine**, v. 126, n. 3, p. 192–199, 2013.

SCHWARTZ, P. J. et al. Autonomic mechanisms and sudden death: New insights from analysis of baroreceptor reflexes in conscious dogs with and without a myocardial infarction. **Circulation**, v. 78, n. 4 I, p. 969–979, 1988.

SEVER, P. S.; POULTER, N. R. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. **Journal of hypertension**, 7.1: S9-12, 1989.

SHANKS, J. et al. Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 305, n. 7, p. 980–986, 2013.

SHARE, L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. **Physiological Reviews**, v. 68, n. 4, p. 1248–1284, 1988.

SHATTOCK, M. J. Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a drugable target in disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 160–166, 2009.

- SILVA, O. A. Impacto da hiperglicemia gestacional sobre o padrão morfofuncional cardíaco da prole adulta. Teses de Doutorado - Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.
- SILVA, J. A. et al. Exercise training can prevent cardiac hypertrophy induced by sympathetic hyperactivity with modulation of kallikrein-kinin pathway and angiogenesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- SIMMERMAN, H. K. B. et al. A leucine zipper stabilizes the pentameric membrane domain of phospholamban and forms a coiled-coil pore structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 10, p. 5941–5946, 1996.
- SOLARO, R. J. Modulation of cardiac myofilament activity by protein phosphorylation. **Comprehensive Physiology**, 264-300, 2011.
- TAKIMOTO, E. et al. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 214–222, 2005.
- TAKIMOTO, E. Cyclic GMP-dependent signaling in cardiac myocytes. **Circulation Journal**, v. 76, n. 8, p. 1819–1825, 2012.
- TEIXEIRA-DA-SILVA, J. J. et al. Chronic administration of Sildenafil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by decreasing COX-2 expression and oxidative stress. **Life Sciences**, v. 225, n. January, p. 29–38, 2019.
- TOBLLI, J. E. et al. Functional and morphological improvement in erectile tissue of hypertensive rats by long-term combined therapy with phosphodiesterase type 5 inhibitor and losartan. **Journal of Sexual Medicine**, v. 4, n. 5, p. 1291–1303, 2007.
- TRIGGLE, David J. L-type calcium channels. **Current Pharmaceutical Design**, 12.4: 443-457, 2006.
- TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research**, 48.3: 309-319, 1981.
- TU, H. et al. Reduced expression and activation of voltage-gated sodium channels contributes to blunted baroreflex sensitivity in heart failure rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 15, p. 3337–3349, 2010.
- ULATE MONTERO, G.; ULATE CAMPOS, A. El calcio en los miocitos cardíacos y su papel en las miocardiopatías. **Revista Costarricense de Cardiología**, v. 8, n. 1, p. 19–25, 2006.
- VALENTI, V. et al. Avaliação da função barorreflexa em ratos jovens espontaneamente hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, n 3, p. 216–221, 2009.
- VEGA, R. B.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 36981–36984, 2003.
- VILA-PETROFF, M. et al. CaMKII inhibition protects against necrosis and apoptosis in irreversible ischemia-reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 4, p. 689–698, 2007.

- VOIGT, N. et al. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ Leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. **Circulation**, v. 125, n. 17, p. 2059–2070, 2012.
- WANG, G. et al. Sildenafil protects against myocardial ischemia-reperfusion injury following cardiac arrest in a porcine model: Possible role of the renin-angiotensin system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 27015–27031, 2015.
- WANG, X. et al. Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in Sildenafil-induced late cardioprotection. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 44, n. 1, p. 105–113, jan. 2008.
- WARD, M. L. et al. Non-steady-state calcium handling in failing hearts from the spontaneously hypertensive rat. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 460, n. 6, p. 991–1001, 2010.
- WEST, T. M. et al. Phosphodiesterase 5 Associates With β 2 Adrenergic Receptor to Modulate Cardiac Function in Type 2 Diabetic Hearts. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 15, p. 1–19, 2019.
- WILLIAMS, B. et al. **2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension**. [s.l: s.n.]. v. 39
- YAGUAS, K. et al. Chronic Sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension. **American Journal of Nephrology**, v. 31, n. 4, p. 283–291, 2010.
- YAMAGUCHI, N. et al. Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 23480–23486, 2003.
- YE, F. et al. The regulatory mechanisms of Yulangsan MHBFC reversing cardiac remodeling in rats based on eNOS-NO signaling pathway. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 117, n. June, p. 109141, 2019.
- YEN, T. ;PAO-LO, Y; HAROLD, R., WILLARD, P. . A genetic study of hypertension in okamoto-aoki spontaneously hypertensive rats. **Heredity**, 33 (3), 309-316, (1974).
- ZHANG, D.; MUELLEMAN, R. L.; LI, Y. L. Angiotensin II-superoxide-NF κ B signaling and aortic baroreceptor dysfunction in chronic heart failure. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 1–10, 2015.

APÊNDICE A

SILDENAFIL, UM INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE 5, É EFICAZ NA HIPERTENSÃO ARTERIAL?

UMA REVISÃO DE ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

Introdução

A hipertensão arterial (HA) é caracterizada pelo aumento sustentado dos níveis pressóricos em relação aos valores estabelecidos como fisiológicos: 120 / 80mm Hg (RUBIO, FRANCISCO, GUERRA, 2018; WILLIAMS et al., 2018). Esse distúrbio de origem multifatorial, acomete uma grande parte da população mundial e representa o mais importante fator de risco para doença cardiovascular (DCV), acidente vascular cerebral (AVC) (KOLETTIS et al., 2010) e insuficiência renal (ELMES et al., 2008). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde/Organização Panamericana da Saúde (OMS/OPAS, 2018), cerca de um bilhão de pessoas no mundo sofrem de HA e estima-se que entre 2000 e 2025, cerca de 560 milhões de pessoas serão acometidas por esta doença (POULTER, PRABHAKARAN, CAULFIELD, 2015). No Brasil, as DVC são as principais causas de internamentos e de mortalidade. Os inquéritos populacionais têm indicado que 30 milhões brasileiros são portadores de HA (BARROSO, WEIMAR KUNZ SEBBA, et al., 2020).

Uma das complicações da HA é a hipertrofia cardíaca (WILLIAMS et al., 2018), (MUTLAK, KEHAT, 2015), devido a persistente sobrecarga de trabalho que leva a dilatação da câmara ventricular com função contrátil comprometida (BERNARDO et al., 2010; NAKAMURA, SADOSHIMA, 2018). Segundo LI e colaboradores (2015) na cardiomiopatia hipertensiva ocorre redução da contratilidade cardíaca, da duração da sístole (contração) e da liberação intracelular de Ca^{2+} , provavelmente por alteração das proteínas reguladoras deste cátion nos cardiomiócitos. Neste contexto, o músculo ventricular exposto à sobrecarga, expressa maiores níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que contribui para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (LI et al., 2002;

AFANAS'EV, 2011). Diversos estudos evidenciaram que o desequilíbrio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) contribui para o estresse oxidativo e diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) endotelial (NGUYEN, TOUYZ., 2011; FLOREA, COHN, 2014; SILVA et al., 2014). Dessa forma, o miocárdio sofre não apenas hipertrofia, mas também infiltração de células inflamatórias que terminam em deposição de colágeno, alterando a contratilidade e o relaxamento do músculo cardíaco, bem como suas funções hemodinâmicas (CONRAD et al., 1995). A hipertrofia cardíaca concêntrica por sobrecarga da HA (DE SIMONE, 2004) e alterações nos vasos sanguíneos pode evoluir para insuficiência cardíaca (IC) (LÓPEZ-VIDRIERO, 2005).

Os modelos animais de hipertrofia cardíaca são amplamente utilizados, alguns modelos induzem sobrecarga de pressão (ex. constrição e/ou bandagem da aorta), sobrecarga de volume (shunt da aorta/veia cava) e a utilização de substâncias vasoativas na indução da hipertrofia, como a angiotensina II (ANG II) e L-NAME (L-NG-Nitro arginina metil-éster) um inibidor da óxido nítrico síntase (PATRUCCO et al., 2014; FERREIRA-MELO et al., 2006; ROSSONI; 2007; SALLOUM et al., 2008). Dentre os vários modelos experimentais de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) os mais utilizados induzem alterações nos níveis pressóricos, provocando uma sobrecarga ventricular (MILL, 2001). Todavia, é possível induzir HVE através de mecanismos não-pressóricos ou humorais como administração de isoproterenol (ISO), um agonista beta-adrenérgico não-seletivo (PATRUCCO et al., 2014; HASSAN et al., 2005; MAHMOOD et al., 2017).

Vários fármacos anti-hipertensivos e cardioprotetores foram desenvolvidos nas últimas décadas para o manejo da HA, entretanto, alternativas farmacológicas ainda estão sendo exploradas para mitigar o impacto da doença. O Sildenafil (SILD) amplamente utilizado durante os últimos 20 anos no tratamento da disfunção erétil e mais recentemente no manejo da hipertensão pulmonar, parece ter também um efeito cardioprotetor e anti-hipertensivo, modulando a resposta miocárdica durante a estimulação simpática crônica (ISIDORI et al., 2015; LEE et al., 2010; BORLAUG et al., 2005) e a resposta endotelial devido a seu efeito antioxidante (YAGUAS et al., 2010; SCHWARTZ et al., 2010; MAULIK & KUMAR, 2012; TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019). Parte do efeito benéfico do SILD deve-se a inibição da fosfodiesterase 5 (PDE5a),

aumentando desta forma os níveis de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e, conseqüentemente, a atividade da proteína quinase G (PKG) e sua cascata efetora em células excitáveis. Portanto, a fim de avaliar se há evidências suficientes sobre a eficácia do SILD como anti-hipertensivo e cardioprotetor o objetivo deste estudo foi revisar sistematicamente os efeitos deste fármaco em relação ao efeito anti-hipertensivo em estudos pré-clínicos conduzidos em ratos e camundongos.

Metodologia

Protocolo e registro

Esta revisão foi conduzida de acordo com as recomendações da Colaboração Cochrane para Revisões Sistemáticas e relatando seguindo a lista de verificação da versão pré-impressa dos Itens de Relatório Preferidos para Revisões Sistemáticas e Meta-análises (PRISMA) 2020 para artigos e resumo.

Critério de eleição

Critérios de inclusão e exclusão

Estudos pré-clínicos em ratos e camundongos avaliando os efeitos de SILD em monoterapia ou em terapia combinada, com presença de um grupo de controle-na HA e ou doença cardíaca. Foram utilizados como critério de exclusão os estudos *in vitro*, testes clínicos, estudos descritivos, revisões sistemáticas, diretrizes, resumos/ resumos estendidos, estudos sem grupo controle ou onde não foi confirmado comprometimento cardíaco ou hemodinâmico do modelo animal. Esta tarefa foi realizada por dois dos investigadores.

Estratégia de pesquisa e seleção de estudos

Baseamos a estratégia de pesquisa na pergunta PICO: O SILD tem efeito anti-hipertensivo e cardioprotetor em ratos e camundongos? Foi executada em 3 bancos de

dados eletrônicos (PubMed, Embase e Web of Science), e em uma fonte de literatura cinzenta (Gray Matters). As fontes foram consultadas pela última vez em 23 de junho de 2021. Os termos MeSH usados foram: "Rats", "Mice", "Sildenafil Citrate", "Arterial Pressure", "Cardioprotection". Tanto o MeSH quanto os outros termos de entrada foram adaptados corretamente de acordo com as regras de sintaxe de cada fonte. Os operadores booleanos (OR, AND) foram usados para combinar os termos. Todas as citações encontradas foram inseridas em um software de gerenciamento de referências (Mendeley), e as duplicatas foram excluídas manual e automaticamente. Cerca de 89 manuscritos foram recuperados para leitura completa. As discordâncias entre os investigadores foram resolvidas por consenso.

Extração de Dados

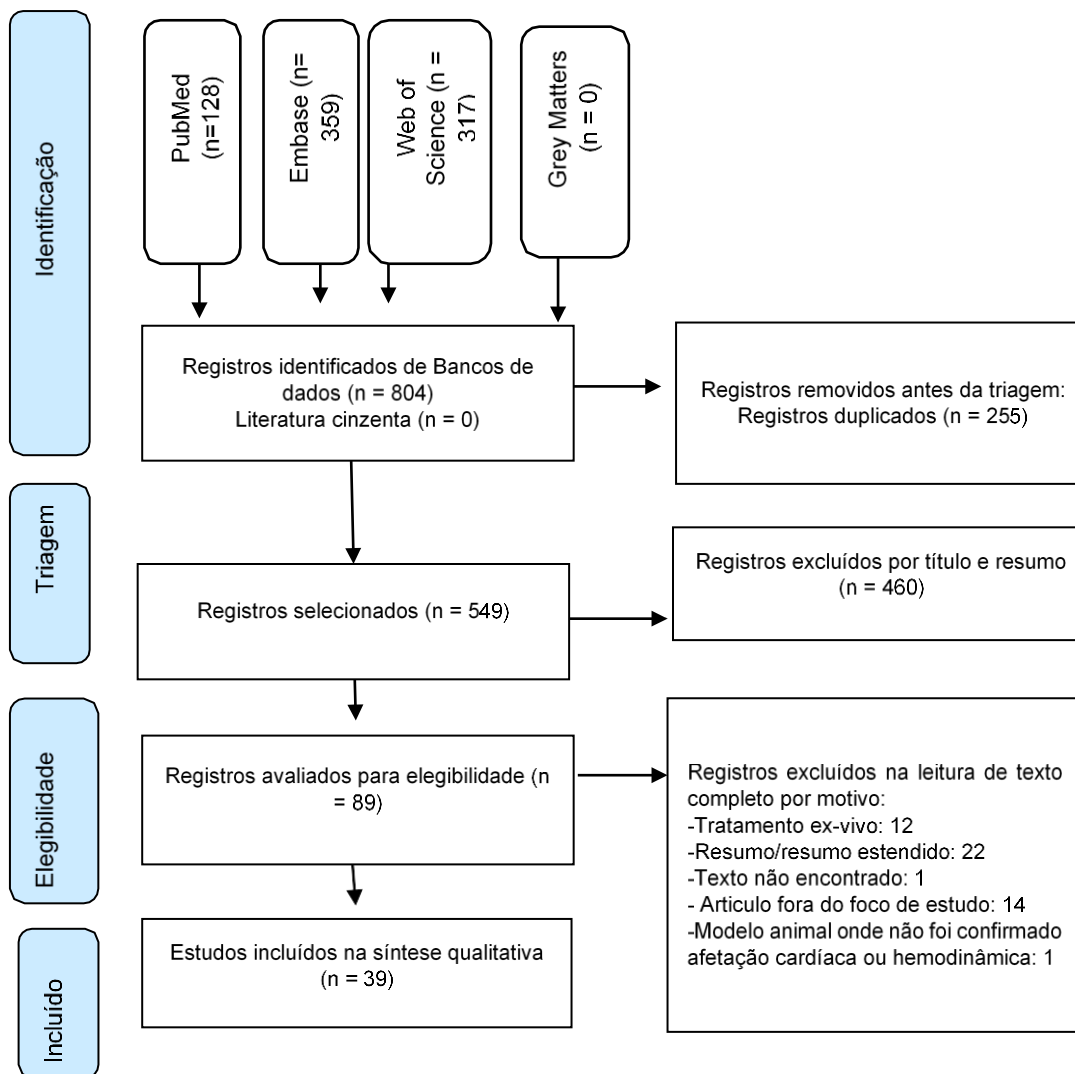
A coleta de dados foi realizada por dois investigadores, extraindo de cada estudo as seguintes informações: Autor, ano, país, modelo animal e tamanho da amostra, dose, duração do tratamento, e efeitos hemodinâmicos e/ou cardioprotetores da terapia, (Tabelas 2, 3 e 4).

Resultado

Seleção de estudos

Foram identificados 804 artigos na pesquisa de banco de dados. Após a remoção das duplicatas, foi examinado 549 estudos por título e resumo, 89 documentos de texto completo para elegibilidade potencial; 50 artigos não atenderam aos critérios de inclusão pelas razões expressas na Figura 1. Finalmente 39 estudos foram incluídos para análises qualitativas.

Figura 1. Diagrama de fluxo do PRISMA 2020 resumindo cada fase desta revisão sistemática.



Fonte: o autor (2021).

Características dos estudos incluídos

Entre os 39 estudos que atenderam aos critérios de inclusão, 15 deles foram realizadas em camundongos (Tabela 2) e 24 em ratos (Tabelas 3 e 4). Dentro dos estudos com ratos, em 10 artigos foram usados o modelo de isquemia e reperfusão

cardíaca (MI/R) e o restante utilizou outros modelos de indução de doença cardiovascular (DCV). Em geral, o SILD foi usado em todos os estudos, como único fármaco (23 estudos= 59%) ou como terapia combinada (16 estudos=41%). Todos os fármacos foram administrados *in vivo*, por via intraperitoneal (15 estudos= 38,4%), por via subcutânea (1 estudo = 2,5%), por via intravenosa (3 estudos=7,7 %), por via oral por gavagem (12 estudos = 30,7%) ou em ração ou na água de beber (8 estudos = 20,5%) A terapia com SILD consistiu em uma dose única (12 estudos = 30,7%) ou tratamento crônico (27 estudos = 69,3%).

Em relação aos parâmetros avaliados, 7 artigos (17,9%) mensuraram aspectos hemodinâmicos como pressão arterial (PA) frequência cardíaca (FC) e integridade vascular (excluindo vasos coronários), em 19 estudos (48,7%) foram avaliados só aspectos cardíacos relacionados a cardioproteção como: efeito anti-hipertrofico, anti-fibrótico, anti-inflamatório, antioxidante, anti-apoptótico e anti-necrótico (melhora da zona infartada). Nesses estudos também se avaliou o efeito preservador da funcionabilidade contrátil e relaxante do miocárdio e de vasos coronários. Finalmente, 13 estudos (33,3%) avaliaram tanto aspectos hemodinâmicos quanto cardíacos.

Em 8 estudos (40%) os parâmetros hemodinâmicos foram registrados invasivamente (cateter intra-arterial) e em 8 estudos (40%); de forma não invasiva (pletismografia de cauda); usando a combinação de métodos em 2 estudos (10%). Registro por telemetria foi feito em 2 estudos (10%). Todos os ensaios utilizaram modelos animais com alterações hemodinâmicas e / ou cardiovasculares confirmadas (pré-existentes ou induzidas).

Em relação ao benefício do SILD, foi demonstrado seu efeito anti-hipertensivo em 17 de 20 estudos onde foi testado, diminuindo a PA quando usado em monoterapia (15 estudos) e em terapia combinada (2 estudos). Efeito protetor vascular (excluindo artérias coronárias) foi visto em 9 estudos (Tabela 1)

Quanto ao papel do SILD como cardioprotetor, foi avaliado seu efeito anti-hipertrofico em 13 estudos; sendo efetivo em 10 deles. O efeito anti- fibrótico, anti-inflamatório e antioxidante foi demonstrado em 5, 4 e 9 estudos respectivamente. Sua

eficácia em reduzir a área infartada pós- isquemia (diminuindo a apoptose e necrose) foi avaliado em 18 estudos, conseguindo resultados positivos em 17 deles. Por último, SILD conseguiu preservar a função contrátil e relaxante do miocárdio em 12 de 13 estudos e melhorou a integridade e fluxo dos vasos coronários em 2 dos 3 estudos, onde foi avaliado (Tabela 1).

Tabela 1. Indicadores hemodinâmico- vascular e de cardioproteção do Sildenafil avaliados em camundongos e ratos. **X** : efeito importante, **X***: efeito importante em terapia combinada com Atorvastatina., **X****: efeito importante em terapia combinada com BAY 41 22272, **X** : efeito importante, dose baixa, **_** : sem efeito, **_** [↑] : sem efeito, dose alta, **/** : efeito débil. **A**: Efeito Antihipertensivo, **B**: Efeito protetor vascular **C**: Efeito anti-hipertrofico, **D**: Efeito anti-fibrótico, **E**: Efeito anti-apoptotico, anti-necrotico (melhora em zona infartada), **F** : Efeito anti-inflamatório, **G**: Efeito antioxidante, **H**: Efeito preservador da funcionabilidade contráctil e relaxante do miocárdio., **I** : Efeito protetor em vasos coronário.

Estudo	Indicador hemodinâmico		Indicador de cardioproteção							Modelo animal
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Ebrahimi et al., 2009					x		x			Camundongo
Shalwala, et al., 2014			X		x	x				Camundongo
Blanton et al., 2012			X							Camundongo
Dias et al., 2014	x						x			Camundongo
Fanhing et al., 2015	x	x								Camundongo
Roberts et al., 2016	x	x								Camundongo
Salloum et al., 2008			X		x			x		Camundongo
Salloum et al., 2007					x			x		Camundongo
Salloum et al., 2003					x				_	Camundongo
Li et al., 2016			X	x			x	x		Camundongo
Patrucco et al 2014			_	x						Camundongo
Chau et al., 2011			X	x	x			x		Camundongo
Wang et al, 2008					x		x			Camundongo
Takimoto et al., 2009			X					x		Camundongo
Nio et al., 2020	x		X					x		Camundongo
Alanova et al., 2014	/				x					Rato
Zaoboryj et al., 2019					x		x			Rato

Lee et al., 2012			–							Rato
Hadi et al., 2016					x	x				Rato
Perez et al., 2007	–		X	x	–					Rato
Lee et al., 2014					x			x		Rato
Koneru., 2008					x			x	x	Rato
Rosanio., et al., 2006	x	x *			x					Rato
Milano et al., 2011		x	X		x					Rato
Kolettis et al., 2010	x							x ↓ – ↑		Rato
Andersen et al., 2013	x**		–					–		Rato
Wen et al., 2020				x		x	x			Rato
Doghri et al., 2019	x							x	x	Rato
George et al., 2013	x									Rato
Hassan et al., 2005			x							Rato
Ferreira-Melo et al., 2006	x	x			x			x		Rato
Dabiré et al., 2020	x						x			Rato
Mahmood et al. 2017					x	x				Rato
Behr-Roussel et al., 2008	x									Rato
Yaguas et al., 2010	x	x								Rato
Rehse et al 1999	x	x								Rato
Rossoni., 2007	x	x			x			x		Rato
Botha., 2010	x							x		Rato
Guimarães et al 2013	x x*	x					x			Rato

Discussão

A presente revisão sistemática identificou que o SILD um fármaco com potencial efeito anti-hipertensivo e cardioprotetor em modelos murinos (camundongos e ratos). O benefício terapêutico e conseguido em parte pela capacidade já conhecida de manter os níveis de GMPc e a atividade PKG; assim como outros mecanismos moleculares envolvidos na cardioproteção.

Efeito anti-hipertensivo do Sildenafil em camundongos

O efeito anti-hipertensivo do SILD em camundongos foi avaliado por vários estudos. DIAS e colaboradores (2014) em um modelo de hipertensão renovascular: 2 rins 1 clip (2K1C) registraram uma redução da pressão arterial média (PAM), diminuição dos níveis de ANG II intrarrenal e do estresse oxidativo. FANHING e colaboradores (2015), também no modelo 2K1C mostram que o fármaco amenizou os níveis de PAM e diminuiu a resposta contrátil à noradrenalina na artéria mesentérica, isto associado à recuperação da superfície endotelial e à abolição do estresse oxidativo. Em camundongos knockout para a oxido nítrico sintase endotelial eNOS+/-, o SILD diminuiu a PAM em reduzindo a contração vascular máxima, induzida por fenilefrina, melhorando o relaxamento vascular máximo induzido por acetilcolina, (ROBERTS et al., 2016). Do mesmo modo, NIO e colaboradores (2020) evidenciaram uma diminuição significativa da pressão arterial sistólica (PAS) em camundongos modelo de hipertensão DOCA+UNx-KKAY (acetato de desoxicorticosterona-sal hipertensivo uni-nefrectomizado KKAY) tratados com SILD.

Efeito anti-hipertensivo do Sildenafil em ratos

O efeito anti-hipertensivo do SILD em ratos foi avaliado em vários estudos. No modelo MI/R, ROSANIO e colaboradores (2006) mostraram que o fármaco diminui a PAM e quando combinado com atorvastatina (ATV) aumenta a atividade das oxido nítrico sintase: constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS), a expressão da endotelial (eNOS) assim como a forma fosforilada das duas últimas (p-iNOS, p-eNOS). No mesmo modelo, KOLETTIS e colaboradores (2010), administrando de forma aguda ou crônica o SILD, observaram redução da PAS. Efeito menos alentadores foram notificados por ALANOVA e colaboradores (2014) que observaram redução transitória da PAM em MI/R em condições de normóxia e hipóxia; e por PÉREZ e colaboradores (2007) sem alterações na PAM, e na pressão sistólica /diastólica final do ventrículo esquerdo (VE).

O efeito anti-hipertensivo do SILD foi também avaliado em diversos modelos de ratos com hipertensão espontânea ou induzida. ANDERSEN e colaboradores (2013)

mostraram que a terapia combinada com BAY 41 22272 (o estimulador de guanilato ciclase, aumentou os níveis de GMPc, baixou os valores da PAM e aumentou o débito cardíaco e a pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) em ratos Wistar Galas submetido a bandagem da artéria pulmonar (BAP). DOGHRI e colaboradores (2019) demonstraram que SILD reduziu significativamente a PA e a vasoconstricção induzida por fenilefrina na aorta, em animais alimentados com dieta de cafeteria (hipercalórica).

SILD reduziu significativamente a PA em ratos tratados com L-NAME restaurando os níveis vasculares de GMPc e efeito vasorrelaxante (FERREIRA-MELO et al., 2006; ROSSONI, 2007). Em ratos com a pressão de perfusão uterina reduzida (RUPP) os níveis pressóricos foram melhorados, provavelmente pelo o aumento nos níveis de GMPc na medula renal (GEORGE et al., 2013).

BEHR-ROUSSEL e colaboradores (2008) evidenciaram que o SILD reduziu a elevada PAM induzida por dieta rica em frutose (FFR); com modulação da geração de vasoconstritores derivados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ciclooxigenases. No modelo de hipertrigliceridemia e resistência à insulina, o tratamento com SILD diminui a PA de forma dose dependente, (REHSE et al 1999). Efeitos semelhantes foram reportados por GUIMARÃES e colaboradores (2013) em ratos 2K1C onde sozinho ou combinado ATV, reduziu a PAS, induzindo efeitos antioxidantes e de melhora na função endotelial. Resultados similares foram obtidos por DABIRÉ e colaboradores (2020) na hipertensão induzida por sorafenibe (inibidor de tirosina quinase), e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (YAGUAS et al., 2010) assim como em ratos modelo de transplante cardíaco (BOTHAS, 2010).

Efeito cardioprotetor do Sildenafil em camundongos

O efeito cardioprotetor do SILD em camundongos foi avaliado em diversas pesquisas. Em modelo de MI/R, SALLOUM e colaboradores (2003) mostraram seus efeitos cardioprotetores, com aumento na expressão de eNOS e iNOS, mas sem alteração no fluxo coronário pré e pós-MI. Os autores observaram atenuação da cardiomiopatia isquêmica, através da ativação seletiva do receptor de adenosina 1;

limitando a necrose e apoptose, preservando a função do VE possivelmente através do aumento da expressão de eNOS e iNOS, e da relação entre moléculas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas Bcl-2/Bax (proteína 2 de linfoma de células B / proteína X associada a BCL-2, respectivamente); assim como pela ativação de uma via dependente de óxido nítrico (ON) (SALLOUM et al., 2007; 2008). Foi também demonstrado que o SILD promove cardioproteção em camundongos pós MI, que foi atribuída a preservação da fração de encurtamento (FS), diminuição da hipertrofia, atenuação da fibrose e apoptose cardíaca (CHAU et al., 2011). Os mesmos autores também reportaram aumento dos níveis de PKG e da razão Bcl-2-/Bax, assim como inibição da via RhoA/RhoCK (família de genes homólogos de Ras, membro A e sua proteína quinase associada, respectivamente) (CHAU et al., 2011). Em condições experimentais semelhantes, a remodelagem pós- MI e a disfunção contrátil foi mitigada pelo SILD, que atenuou a expressão das proteínas fibróticas MMP2 e MMP9, restabelecendo a atividade da PKG miocárdica e aumentando a expressão e sinalização da sirtuina 3 (Sirt 3) (LI et al., 2016). No mesmo sentido SHALWALA e colaboradores (2014) e WANG e colaboradores (2008) mostraram um aumento na atividade da sirtuina1 (Sirt 1) cardíaca, e da atividade dos mito-KCa²⁺ e mito-KATP, (canais mitocondriais para o K⁺ ativados pelo cálcio e o ATP respectivamente) como mecanismo contribuinte para a cardioproteção.

Em camundongos selvagens (WT), mas não em knockout para o regulador de sinalização de proteína G2 (Rgs2^{-/-}), a ativação da PKG por SILD suprimiu a hipertrofia cardíaca, inibindo estímulos acoplados à proteína Gq (PGq). Também melhorou a FE, e a contração e relaxamento em Rgs2^{+/+} com constrição da aorta (TAC), o que não foi observado em Rgs2^{-/-} (TAKIMOTO et al., 2009). O aumento da translocação da proteína quinase G α de membrana, dependente de GMPc (PKG 1- α), e do RGS2 após uma semana da TAC, medeia os efeitos anti-hipertrofos e cardioprotetores iniciais do SILD. Neste contexto, BLANTON e colaboradores (2012) mostraram em camundongos WT, mas não em LZM (mutantes leucine zipper), que o SILD inibiu a hipertrofia cardíaca induzida por TAC e a disfunção sistólica do VE. As atividades de uma série de vias reguladas por GMPc e PKGI, incluindo calmodulina quinase II (CaMKII), calcineurina (CN), quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e proteína cinase B (AKT) não diferiram em corações oriundos de camundongos LZM + TAC em comparação com corações

WT+TAC. Outros autores também evidenciaram uma diminuição na hipertrofia ventricular em camundongos DOCA+UNx-KKAY , e dos níveis de RNAm do peptídeo natriurético cerebral (BNP (NIO et al., 2020). Este efeito anti-hipertrofico foi leve na hipertrofia induzida por ANG II (PATRUCCO et al., 2014). Em camundongos diabéticos tratados com SILD foi observado redução da apoptose celular cardíaca e da atividade enzimática da caspase-3, além de aumento da atividade antioxidante (EBRAHIMI et al., 2009).

Efeito cardioprotetor do Sildenafil em ratos

O potencial cardioprotetor do SILD em ratos, foi testado em condições de MI/R. Neste contexto, ALANOVA e colaboradores (2014) mostraram redução do tamanho do infarto em ratos expostos a normoxia e hipoxia antes da I/R, resultados estes que foram corroborados por ZAOBORY e colaboradores (2019), que observaram proteção da função mitocondrial e da função contrátil do VE. No mesmo estudo, foi observado que o SILD reduziu os níveis de glutatona oxidada (GSSG) e restaurou parcialmente a proporção GSSG/GSH2 (glutatona reduzida), aumentando a relação de p-eNOS/eNOS, juntamente com uma melhoria no equilíbrio redox. HADI e colaboradores (2016) por sua vez, evidenciaram diminuição na área infartada, com aumento nos níveis de interleucina 10 (IL-10) cardíaca e de GSH plasmática, redução do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) , interleucina 6 (IL-6) , Bax, caspasa 3, troponina cardíaca (cTnT), no grupo tratado com SILD quando comparado com MI/R + salina. SILD foi capaz de reduzir as áreas de infarto, melhorando as características morfológicas e mecânicas das mitocôndrias (LEE et al., 2014) controlando a apoptose, restaurando os níveis de GMPc , aumentando os níveis de nitritos e nitratos (Nox) no plasma (MILANO et al., 2011) e reduzindo a apoptose de células endoteliais com aumento na densidade capilar na área pré-infartada (KONERU, 2008).

Segundo KONERU (2008), o SILD levou ao aumento da expressão de mRNA do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e da angiopoietina-1, assim como a fosforilação/ativação de Akt e eNOS. Por outro lado, os parâmetros de funcionalidade cardíaca do VE como fração de ejeção (FE) e FS foram aumentados, enquanto o diâmetro interno do ventrículo esquerdo (LVID) foi reduzido. A associação de SILD e

atorvastatina (ATV) aumentou a atividade de cNOS iNOS e a expressão de eNOS, p-eNOS e iNOS (ROSANIO., et al., 2006).

Outros estudos com SILD utilizando modelo de MI/R foram menos promissores, assim, KOLETTIS e colaboradores (2010) mostraram que os efeitos do SILD foram dependentes da dose e que a contração do VE na isquemia tendeu a ser menor apenas em altas doses, a recuperação pós-isquêmica foi maior em baixas doses. A administração crônica de SILD deteriorou a função ventricular esquerda durante a MI/R. Segundo LEE e colaboradores (2012) não houve modificação na morfologia macroscópica do coração, nem diferenças no tamanho do infarto em ratos tratados com SILD, porém, o seu efeito benéfico sobre a hiperinervação simpática e em arritmias foi atribuído à ativação dos canais K-ATP e o aumento do teor de GMPc. De acordo com os resultados de PÉREZ e colaboradores (2007), SILD não modifica o tamanho do infarto, mas reduz a hipertrofia cardíaca e o conteúdo de colágeno em miócitos ventriculares, aumentando a atividade da PKG-1 e inibindo significativamente a atividade do trocador Na⁺/H⁺ isoforma 1 (NHE-1) pós- MI.

O SILD também foi avaliado diversos modelos de doença cardiovascular em ratos. Assim, WEN e colaboradores (2020) mostraram que o tratamento com SILD recupera a disfunção cardíaca induzida por queimaduras, diminuindo mais de 90% dos depósitos de colágeno e normalizando os níveis de expressão mRNA de RhoA, ANP e BNP, colágeno I e III, do gene que codifica para a actina alfa 2 do músculo liso (ACTA- α SMA); reduzindo os infiltrados inflamatórios e normalizando os níveis de MDA e de antioxidantes. Por outro lado, a administração de SILD antes de ISO diminuiu a hipertrofia cardíaca e lesão celular em ratos, aumentando os níveis de GMPc no miocárdio. Neste caso, a integridade da função da NOS foi essencial para a cardioproteção mediada por SILD (HASSAN et al., 2005). O SILD também reduziu a área total da lesão miocárdica e atenuou a remodelação do músculo liso vascular induzida por L-NAME, isto provavelmente mediado por aumento nos níveis de GMPc cardíaco e vascular (FERREIRA-MELO et al., 2006). Ademais, que suprimiu a severidade do infarto cardíaco, reduziu os níveis de IL-1 β e TNF α em células miocárdicas de animais que receberam ISO (MAHMOOD et al. 2017).

No modelo de hipertrigliceridemia e resistência à insulina, o tratamento com SILD diminuiu a hipertrigliceridemia secundária ao consumo de dieta rica em frutose (REHSE et al 1999). De igual maneira, reduziu a disfunção ventricular e os níveis de creatina quinase e lactato desidrogenase em ratos pós-MI (ROSSONI, 2007). O pré-condicionamento com SILD, melhorou a função sistólica e diastólica no coração transplantado (BOTHAS., 2010) e a atividade vaso contráctil coronariana frente a fenilefrina (DOGHRI et al., 2019). Por último, o SILD falou em inibir o desenvolvimento de hipertrofia e falha do VD e da fibrose intersticial em ratos Wistar submetidos a BAP (ANDERSEN et al., 2013)

Tabela 2. Efeitos anti-hipertensivo e/ou cardioprotetor do Sildenafil (SILD) em camundongos

Autor ano País	Modelo Experimental (amostra total)	Dose de Sildenafil (Sild)/ Duração do tratamento	Tratamento combinado	Parâmetros avaliados		Resultados observados com Sildenafil
				Hemodinâmica	Cardioproteção	
Ebrahimi et al., 2009 Irã	Camundongos suíços DM por STZ N = 40	0,71 mg/kg via I.P. 2 semanas	---	---	Apoptose de cardiomiócitos por ensaio de TUNEL e caspasa-3. Avaliação de peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes.	Grupo DM, redução do apoptose e da atividade caspasa-3 e níveis de MDA; Aumento das atividades das enzimas CAT, SOD e GSH-Px.
Shalwala, et al., 2014 Estados Unidos	Camundongos ICR MI/R N = 9	0,7 mg/kg, IP Dose única	---	---	Langendorff, Imunoprecipitação e Western blot para atividade e expressão de SIRT1.	O Sildenafil reduziu significativamente o tamanho do infarto para 22,3±7,6% (P < 0,001) em comparação com o grupo controle. Sildenafil aumentou a atividade cardíaca SIRT1 em comparação com os controles (P<0,001).
Blanton et al., 2012 Estados Unidos	Camundongos LZM (mutação para PKGI α) e WT (selvagens). TAC N = 22	200 mg/kg/dia na dieta. 3 semanas	---	---	Ecocardiografia., HW/TL (hipertrofia cardíaca) Histologia cardíaca. Imunoblotting para medição de PKGI comum JNK, fosfo-JNK, MKK4, fosfo-MKK4 e PKGI b.	Constricção da aorta (TAC) induziu disfunção sistólica e diastólica em LZM. No 7º dia, TAC promoveu hipertrofia cardíaca comparada aos controles. SILD ↓ hipertrofia em WT, mas não em LZM. No 21º dia, TAC induziu insuficiência cardíaca e mortalidade em LZM. FE cardíaca foi atenuada por Sild (46,2±5,1% no grupo WT-TAC+ Sild comparado ao grupo WT-TAC +salina). Sild não preservou a FE do VI no grupo LZM -TAC, com redução de 62,6±0,6% no LZM -SHAM para 20,2±2,5% no grupo salina LZM-TAC e redução semelhante a 19,3±2,8% no grupo LZM TAC+ Sild (P=ns salina vs Sild) .TAC ↑ relação HW/TL que é atenuada por Sild; isso não ocorre no grupo LZM-TAC.

Dias et al., 2014	Camundongos WT e C57BL/6	40 mg/kg/dia / V.O. gavagem	---	PAM e FC registrados de forma invasiva (cateter inserido na artéria carótida)	---	Camundongos 2K 1C tratado com Sild apresentou ↓ PAM comparados a 2K 1C +salina (125 ± 2 vs. 112 ± 2 mmHg) . Sild abole a taquicardia no grupo (2K1C+ Sildenafil: 472 ± 15 b.p.m. vs. K 1C+salina: 514 ± 7 b.p.m).
Brasil	2K1C N= 24-30	2 semanas				
Fanhing et al., 2015	Camundongos C57BL/6J	40 mg/kg/dia V.O., por gavagem	---	PAM e FC registrados de forma invasiva (cateter inserido na artéria carótida)	---	O número de células endoteliais em animais 2K1C tratados com Sild foi melhorado em comparação a 2K1C não tratados, mas não completamente recuperados quando comparado ao grupo SHAM. A resposta contrátil a Noradrenalina na artéria mesentérica aumentou (56%) em 2K1C e foi reduzida (18%) no grupo tratado.
Brasil	2K1C N= 18	2 semanas		Reatividade mesentérica e citometria de fluxo. Estresse oxidativo (TBARs) na artéria mesentérica		Sild ↓ TBARs no grupo 2K1C.
Roberts et al., 2016	Camundongos WT, eNOS ^{-/-} e hipertensão eNOS ^{+/-} .	0,4 mg/kg/d em água de beber	---	Pletismografia de cauda para registro de PAS e FC.	---	SILD durante a gestação baixa a PAS sem afetar o feto. Grupos WT, WT Sild, eNOS ^{+/-} , eNOS ^{+/-} Sild.
Estados Unidos	N= 33	3 semanas		Reatividade vascular de artérias carótidas.		↑ PAS foi observado em eNOS ^{+/-} e foi ↓ com Sild; não há diferença no grupo WT tratado ou não com Sild. Fetos foram menores no grupo de camundongos prenhes eNOS ^{+/-} . O tratamento com Sild melhorou a resposta de relaxamento da carótida nos camundongos eNOS ^{+/-} Entretanto, nenhuma modificação foi observada no grupo WT tratado com Sild. Sild ↓ PAS, ↑ crescimento fetal e modula a reatividade
Salloum et al., 2007	Camundongos C57BL Camundongos A ₁ AR-KO	0,71 mg/kg, IP.	DPCPX (antagonista do receptor A1) 0,1mg/kg, IP	---	Técnica Langendorff (isquemia global com reperfusão 1h) Cardiomiócitos	Sild : Reduziu a área infartada em C57BL, mas não em A ₁ AR-KO. O antagonista DPCPX bloqueou o efeito do Sild em reduzir o infarto. Não há diferença nos camundongos controles e tratados com DPCPX ou veículo. A cardioproteção foi abolida pelo antagonista do receptor A1 e pela deleção genética de A1AR. A ativação de A1 AR é fundamental na cardioproteção promovida pelo Sild.

Estados Unidos	MI/R N= 48	4 semanas				
Salloum et al., 2008	Camundongos ICR MI/R L-NAME N= 110	0,7 mgs, IP, 4 semanas	L-NAME 15mg/kg, IP	---	Técnica Langendorff. Ecocardiografia. Medição de iNOS, ENOS e Bcl-2 e Bax por Western blot. Hipertrofico cardíaco: relação HW/BW	Sildenafil aumento significativamente iNOS pós- infarto versus controle. Apoptose diminuiu de 2,4 +/- 0,3% com salina para 1,2 +/- 0,1% com Sildenafil no dia 7 e de 2,0 +/- 0,2% para 1,2 +/- 0,1% no dia 28, que foi associado a um aumento precoce na relação Bcl-2-Bax. O LVEDD aumentou do valor da linha de base de 3,6 +/- 0,1 para 5,2 +/- 0,2 e para 5,5 +/- 0,1 mm nos dias 7 e 28, respectivamente, com salina, mas foi atenuado para 4,4 +/- 0,2 e 4,4 +/- 0,1 mm após o tratamento de Sildenafil nos dias 7 e 28, respectivamente. Sildenafil melhorou A FS significativamente pós-isquemia e observou-se declínio acentuado da hipertrofia cardíaca e no tamanho do infarto (40,0 +/- 4,6%) em comparação com salina (69,6 +/- 4,1%)
Salloum et al., 2003	Camundongos ICR MI/R N= 28	0,7mg/kg IP, 24 horas pré- Isquemia- Reperusão Dose única	1400 W (10 mg/kg IP) Dose única	---	Isquemia global 20 min e reperusão 30 min, tamanho do infarto, função contráctil e fluxo coronariano iNOS e eNOS foram medidas por Western bot e RT-PCR após tratamento	O pré-tratamento com Sild (24h antes da I-R) ↓ o tamanho do infarto (6,9 ±1,2%) vs. grupo controle (salina) (27,6 ±3,3%, P<0,05) Sild aumentou a expressão de iNOS e eNOS mRNA. Os níveis dessa transcrição voltaram ao normal 7 horas depois Proteção induzida por Sild foi abolida pelo inibidor de iNOS 1400W (tamanho infarto 23,7 ± 2,8% versus Sildenafil).

Li et al., 2016 China	Camundongos C57BL/6 MI/R N= 15	21 mg/kg IP, BID	---	---	Ecocardiografia no 7° e 28° dia Cardiomiócitos Isolamento mitocôndria do coração Apoptose (Técnica TUNEL) Western blot.	A expressão elevada da proteína PDE5a em corações pós-infartos foi inibida pelo tratamento de Sild. A insuficiência cardíaca pós-infarto suprimiu a atividade da PKG do miocárdio, o que foi abolido pelo tratamento com Sild durante 4 semanas. Sild reduziu significativamente a deposição de colágeno pós-infarto e reverteu a hipertrofia cardíaca. Camundongos com MI apresentaram aumento da cavidade do ventrículo esquerdo e comprometimento da função cardíaca, redução da fração de ejeção. Estes parâmetros foram preservados parcialmente por Sild. ↑colágeno em camundongos MI foi reduzido pelo tratamento com Sild. A remodelagem pós-infarto regulou para cima os marcadores de proteínas fibróticas MMP2 e MMP9 e foi atenuada por Sild. A desordem da ultraestrutura da mitocôndria é piorada por Sild. ↑ Sirt 3
Patrucco et al 2014	Camundongos cGKIβ e βRM e WT. Alemanha Hipertrofia cardíaca por ANG II N= 40	400 mg/L (0,6 mM) em água de bebida.	ANG II 2 mg/kg. infusão contínua	2 A pressão arterial foi monitorada antes e durante o tratamento de ANG II utilizando telemetria 7 dias	Ecocardiografia Relação HW/BW RT-PCR para medir a transcrição de vários genes associados à hipertrofia e fibrose	Camundongos βRM desenvolveram a mesma hipertrofia que os controles WT quando submetidos à constrição da aorta torácica ou infusão de isoproterenol. Camundongos controle βRM e WT (Ctr) da mesma ninhada com infusão de angiotensina II (AII) (7 d; 2 mg · kg/d para induzir hipertrofia. Ambos os genótipos desenvolveram hipertrofia cardíaca, que foi mais pronunciada em animais Ctr. O tamanho dos cardiomiócitos e a fibrose intersticial aumentaram igualmente em ambos os genótipos. Coadministração de Sild durante a infusão de ANG II não teve efeito em camundongos βRM e apenas reduziu ligeiramente a resposta hipertrófica em camundongos WT. Os níveis de mRNA da ANP foram igualmente aumentados em ambos os genótipos por ANG II, e esse aumento foi mantido na presença de Sildenafil. CTGF, TGF-β, Fn1 e colágeno 1 apresentaram aumento significativo tanto nos corações WT quanto βRM. O tratamento de Sildenafil reduziu esse aumento em WT, mas não em camundongos βRM

Chau et al., 2011	Camundongo ICR MI (oclusão da artéria coronária descendente esquerda) N=113	21 mg/kg, IP, BID. 25 dias	KT-5823 (1mg/kg, IP, BID)	Pletismografia de cauda para registro de PAS e FC em animais anestesiados. Hemodinâmica	Ecocardiografia Hipertrofia cardíaca HW/TL Atividade PKG e Rho quinase Foi determinada a fibrose e apoptose. Western blot., para Bcl-2-to-Bax, PKG ex .	Sild aumentou significativamente a FS nos dias 7 e 28 pós-MI. Tanto LVEDD quanto LVESD foram aumentados em camundongos tratados com salina em comparação aos tratados com Sild indicando dilatação cardíaca. Além disso, o AWDT foi maior em animais tratados com Sild versus tratados salina no dia 28 pós-IM. PAS, PAD foi reduzida no grupo tratado com SILD em 1 h pós-tratamento no 7º dia pós- IM. Atividade da PKG cardíaca foi aumentada ($2,93 \pm 0,42$, $P < 0,05$) vs salina ($1,20 \pm 0,27$) 1 dia pós-tratamento com SILD. Fibrose foi reduzida nos animais tratados com SILD ou com Fasudil no 28º dia. Assim como a velocidade de apoptose ($2,8 \pm 0,7$ Sild vs. $7,9 \pm 1,4$ salina). Este estudo, demonstra que o SILD, quando administrado 3 dias após o IM, limita a progressão da IC. A inibição da via RhoA / Rho-quinase media a cardioproteção induzida por SILD e a restrição da IC.
Wang et al., 2008	Camundongos ICR MI/R N= 14	(0,71 mg/kg, IP.) Doses única 24 h pre-MI/R	---	---	A taxa de fluxo coronariano foi medida pela coleta do efluente coronário. Mitocôndrias foram isoladas do rato para análise proteica por Western blot. A expressão de mito KCa- β 1 foi avaliada por quimioluminescência.	O tamanho do infarto foi reduzido de ($25,8 \pm 5,7\%$) no grupo controle para ($11,0 \pm 1,2\%$) em tratado com Sild Sild pós MI/R: corações tendem a ter uma melhor recuperação funcional (indicada pela taxa pós-isquêmica -força produto) em comparação com os controles, embora sem significância estatística. O pré-tratamento Sild não aumentou a expressão mitoKCa- β 1 vs controle.
Takimoto et al., 2009	Camundongos Rgs2-/- Rgs2+/- C57BL/6. TAC N= 28	200 mg/kg/d misturados em alimentos	---	PAM e FC registrados de forma invasiva (cateter inserido na artéria carótida)	Ecocardiografia. Western blot., RT-PCR e análise imunohistoquímica do tecido cardíaco.	Sild reduziu a hipertrofia cardíaca e melhorou a FS, em camundongos controles mas não teve efeito sobre essas propriedades em corações Rgs2-/- TAC. Também melhorou a contração e relaxamento em Rgs2+/- expostos ao TAC, o que não foi observado em camundongos Rgs2-/-. A ativação de enzimas ligadas à Gq (CN, CaMKII e ERK1/2), foi amenizada por Sild em corações Rgs2+/- TAC, mas não em corações de Rgs2-/- TAC. O tratamento de Sild aumentou a translocação de membrana de PKG 1- α e RGS2 após 1 semana de TAC. Em células Rgs2-/- , a localização basal PKG-1 α foi semelhante a células Rgs2+/-

Nio	Camundongos C57BL/6J e KKAY.	30 mg/kg/dia	-	PAS e FC foram medidos por pletismografia.	Hipertrofia cardíaca : HW/TL	Sild reduziu a PAS de camundongos DOCA sal + UNx-KKAY
2020		VO.			Avaliação de NT-proBNP usando	Sild reduz significativamente o peso do VI em camundongos DOCA +UNx-KKAY vs UNx-KKAY +DOCA salina e suprimiu significativamente os níveis de mRNA de BNP ventricular, bem como os de NT-proBNP, em DOCA sal vs UNx-KKAY DOCA = salina.
Japão	DOCA sal + UNx KKAY modelo				kit de imunoenensaio enzimático (EIA)	
	N= 18	3 semanas				

Fonte: o autor (2021).

1400 W: inibidor seletivo de iNOS; 2KIC: 2-rins 1-clipe (hipertensão renovascular); ANG II: Angiotensina II BPM: batimentos por minuto; DM: diabetes Mellitus; Bax : bcl2 proteína X associada; C57BL6: camundongo black-C57; CaMKII: proteína quinase dependente de cálcio / calmodulina II; Caspase-3: cisteína ácido aspártico-protease 3; CAT: catalasa ; cGKI β : animais de resgate de músculo liso cGKI β ; CN: calcineurina ; CTGF : Fator de crescimento de tecido conectivo; ; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento; eNOS $^{-/-}$: camundongos knockout para óxido nítrico sintase endotelial; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; ERK 1/2 : Anti-phospho-MAP Kinase 1/2; FC: frequência cardíaca; Fn1: fibronectina 1; GSH-Px :glutathiona: peroxidasa; ; HW / BW: peso do coração/peso corporal ; HW/TL: peso cardíaco/comprimento da tibia; ICR: Instituto de Pesquisa do Câncer ; I/R : isquemia e reperfusão; iNOS: óxido nítrico sintase induzível. ; I.P.: intraperitoneal ; KT 5823: inibidor seletivo da proteína quinase G; LMZ : leucine zipper mutante; L-NAME: L-NG-Nitro arginina metil- éster: um inibidor da óxido nítrico sintase ; LVEDD : Diâmetro diastólico final do VI; ; LVESD: Diâmetro sistólico final do VI; MDA: malonaldeído; ; MI/R: isquemia miocárdica e reperfusão., MI: isquemia miocárdica ; Mito Kca $^{++}$: canal de potássio mitocondrial ativado por cálcio; NE: Norepinefrina; PAM: pressão arterial media ; PHE: Fenilefrina ; RSG2 : Regulador de sinalização de proteína G 2; RT-PCR: reação de amplificação em tempo real; SOD: superóxido dismutase ; STZ: streptozotocina; TAC:constricção da aorta; TBARS: ensaio de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico ; TGF- β : Fator de crescimento transformador β ; VI : ventrículo esquerdo; VO: via oral ; WT: tipo selvagem.

Tabela 3. Efeitos anti-hipertensivo e/ou cardioprotetor do Sildenafil (SILD) em ratos modelo de isquemia e reperfusão cardíaca (MI/R)

Autor	país	Animal/Modelo experimental	Dose de Sildenafil (Sild) / Duração de tratamento	Dose de terapia combinada	Parâmetros avaliados		Resultados
					Hemodinâmica	Cardioproteção	
Alanova et al., 2014	República Tcheca	Ratos Wistar MI/R exposto a hipóxia (CH) N= 40	0,7 mg/kg/ IV, pre-isquemia. Dose única	Molsidomina (10 mg/kg)	PAM e FC registrados de forma invasiva (cateter inserido na artéria carótida)	Histologia (coloração com permanganato de potássio e 2,3,5 trifeniletazolium).	Sild reduziu o tamanho do infarto do miocárdio em ratos normóxicos e efeito protetor em comparação com os controles. O tamanho do infarto em ratos CH tratados com Molsidomina ou Sildenafil não difere dos animais normóxicos tratados. Sild reduz a PAM nos grupos normóxico e hipóxicos, mas não teve efeito duradouro.
Zaoboryj et al., 2019	Argentina	Ratos WT e DN-Trx1 (transgênico dominante negativo) MI/R N= 25	0,7 mg/kg, IP. Dose única	---	---	Langendorff. Foi avaliado: tamanho do infarto, consumo de oxigênio mitocondrial, níveis de glutatona e atividade trx1 (Tioredoxina)	Sild reduziu o tamanho do infarto no grupo WT, mas não no grupo Trx. Reduziu os níveis de GSSG tanto em WT quanto em DN-Trx1. A razão GSSG/GSH2 foi parcialmente restaurada por Sild aumentou o p-eNOS/eNOS tanto em WT (14%,) quanto em DN-Trx ratos. (35%,).

Lee et al., 2012	Ratos Wistar MI/R Taiwan N= 40	100mg/kg/d VO por gavagem BID. 4 semanas	Glibenclamid a 4mg/kg/dia VO gavagem BID. 4 sem.	PAM e FC registrados de forma invasiva (cateter inserido na artéria carótida) em rato acordado	Distribuição e quantificação de fibras nervosas simpáticas por imuno-histoquímica. Western bot.	Sild não modificou a morfologia macroscópica do coração em ratos Sham. Hemodinâmica e tamanho infarto são similares entre os grupos infartados Sildenafil diminuiu a hiper-inervação simpática vs ratos controles (0,12 ± 0,08% vs. 0,56± 0,17%) Níveis de GMPc (pmol/g) aumentou com Sildenafil (7,18 ± 0,59) vs grupo infartado + salina (5,12 ± 0,62) . Glibenclamida não modificou os níveis de GMPc
Hadi et al., 2016	Ratos albinos MI/R Iraque N=28	0,7 mg/kg pre- LAD. Dose única	---	---	Determinação de cTnT, MDA e GSH plasmático. Medição de TNF-α, IL-6, IL-10, Caspasa 3 e Bax por ELISA. Histopatologia do miocárdio.	O grupo MI/R tratado com Sild reduziu os níveis de (TNF-α, IL- 6, Bax, Caspasa 3, cTnT, MDA) em comparação com o grupo MI/R + salina. Sild diminui a lesão do tecido cardíaco em MI/R E produz uma elevação de IL-10 cardíaca e de GSH plasmático.
Perez 2007	Ratos Wistar MI Argentina N = 15	100 mg /kg/ em água de beber 6 semanas	---	PA e FC foi medida por pletismografia e por medida direta.	Ecocardiografia. Histologia de cardiomiócitos Expressão do BNP por RT-PCR e atividade de NHE-1 VI por imunoblot. Determinação da PKG-1, pHi em músculos papilares isolados do VI.	Sild não modificou a PAM, a pressão sistólica ou a pressão diastólica final do VI (MI: 40± 10% e MI+ Sildenafil: 31±7%). Sild reduziu a hipertrofia cardíaca: (3,30± 0,20 MI,; 2,85 ± 0,04 MI + Sild; Sham+ Sildenafil 2,36 ± 0,04 (MI vs MI + Sild e Sham + Sild). Sild diminuiu o conteúdo de colágeno em miócito ventriculares no grupo MI. Aumentou a atividade do PKG-1 após MI (MI 4,85 ± 0,29 1,62 ± 0,10 IM+ Sild 6,73± 0,41* 1,86± 0,30) em VI.

Lee et al., 2014	Ratos Sprague-Dawley	0,75 mg/kg, IP.	---	---	Alterações morfológicas e mecânicas nas mitocôndrias foram analisadas pela AFM.	Sild reduziu as áreas de infarto ($7,8 \pm 3,9\%$ vs $20,4 \pm 7,0\%$ nos grupos MI/R tratados e não tratados com Sild, respectivamente; redução relativa de 62%).
Coréia	MI/R N= 25	Dose única			A pureza das mitocôndrias isoladas foi confirmada por Western blot.	Sild pre- MI/R reduziu as áreas mitocondriais ($7428 \pm 3682 \text{ nm}^2$; redução relativa de 69,2% em relação ao grupo MI/R) e amenizou a força de adesão das superfícies mitocondriais.
Koneru 2008	Ratos Sprague-Dawley	0,7 mg/kg/IV 30 min.	---	---	Ecocardiografia. Determinação de LVdp/dtmax	O tamanho do infarto foi reduzido para 20% no grupo MI/R + Sild em comparação com o MI/R controle (39%). Sild reduziu a apoptose de cardiomiócitos e célula endotelial e aumentou a densidade capilar na área pré-infarto.
	MI/R	Pré- isquemia			Imunohistoquímica com ensaio TUNEL (para medição de apoptose).	Sild aumentou a expressão de VEGF e ANG-1 mRNA e a fosforilação/ativação de Akt e eNOS; Nível Trx-1 e expressão VEGF – Bcl-2 quando comparado ao controle
Estados Unidos	N= 24	Única dose			RT-PCR e Western blot detectado do VI.	FE e FS de VI foi aumentado no grupo Sild em comparação com o grupo controle e LVID foi reduzido no grupo tratado de Sild
Rosanio et al., 2006	Ratos MI/R	(A) Sild 0,7 mg/kg, e (B) 1 mg/kg. 18 h , IP	Atorvastatina (ATV, 1mg/kg) ATV (10 mg/kg, v.o)	PAM e FC registrados de forma invasiva (cateter inserido na artéria carótida) em rato acordado	Testes de imunoblotting e atividade enzimática do tecido cardíaco	O pré-tratamento de 3 dias com ATV 10 mg / kg / d (oral)., mas não com 1 mg / kg / d, reduziu o tamanho do infarto. Sild ↓ a área infartada: (B) ($11 \pm 2\%$), Sild (A) ($18 \pm 2\%$) e ATV-(A) + Sildenafil (A) ($9 \pm 1\%$) em comparação com os controles ($34 \pm 3\%$; $P < 0,001$). Sild ↓PAM A combinação de Sild e ATV ↑ a atividade de eNOS iNOS e a expressão de eNOS, P-eNOS e iNOS. A iNOS medeia o efeito cardioprotetor, que foi suprimido pelo inibidor específico de iNOS (1400W). ATV 1mg / kg / d oral não alterou as concentrações totais de eNOS ou P-Enos
Estados Unidos		Dose única	1400W (1mg/kg/ IV			

Milano et al., 2011	Ratos Sprague-Dawley	1,4 mg/kg/dia, IP	IntReox	---	Expressão de eNOS e fosforilado (P)-eNOS por Western blot.	Sild ↓ hipertrofia e reduziu o tamanho do infarto para 40,662,6% da área de risco
Arábia Saudita	MI/R	15 dias			Determinação de Akt e P-Akt	Sild controlou a apoptose induzida por hipóxia, e restaurou o nível de GMPc.
	expostos à hipóxia				GMPc medido usando um kit de imunensaio. A atividade caspase-3 foi avaliada pelo kit de ensaio colorimétrico. Hipertrofia do VE e tamanho do infarto (IS) foi avaliado como (VD/[VI+IS]).	Sild ↑ NOx . A combinação de Sildenafil com IntReox potencializa o aumento da NOx (P =0,001 vs. Sildenafil). Ambos os tratamentos levaram a elevação do P-Akt sem efeito sinérgico.
	N= 97					
Kolettis 2010	Ratos Wistar	Tratamento agudo:	---	---	Langendorff. LVDP foi medido como um índice de função sistólica VE	A contração na isquemia tendeu a ser menor após Sild em alta dose. Comparado com controles (62,9 ± 2,0% da pressão desenvolvida na linha de base), a recuperação pós-isquêmica foi maior após baixa dose (75,1 ± 2,4%), inalterada após alta dose (69,1 ± 2,1%), reduzida (42,9 ± 4,5%) após administração crônica de Sild . Em comparação com os controles (71,8 ± 3,9 mmHg), a hipercontração foi maior após administração crônica de Sild (89,5 ± 4,1 mmHg), mas foram similares após a dose baixas (65,7 ± 3,3 mmHg) ou dose alta (67,1 ± 4,7 mmHg, P = 0,43).
	MI/R	0,7 ou 1,4 mg/kg, IP			A hipercontração foi definida como o valor máximo da pressão diastólica VE	
		Dose única				
Grécia	N= 36	Tratamento crônico:				
		0,7 mg/kg Sild, IP, BID.				
		3 semanas				

Fonte: o autor (2021).

ACTA: gene que codifica para alfa actina; AMF: microscopia de força atômica; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; ANP: peptídeo natriurético atrial ATV: Atorvastatina; BAP: constricção ou estenose da artéria pulmonar; BAX :bcl2 proteína X associada; BAY: estimulador de guanilato cyclase (BAY 41-2272) ; Bcl-2: proteína de linfoma de células B; BID: duas vezes no dia BNP: peptídeo natriurético cerebral; Caspase-3: cisteína ácido aspártico-protease 3; CCRC: curvas cumulativas de concentração-resposta; CH: hipóxia crônica; cTnT: Troponina cardíaca T; DHE: dihidroetidum; DN-Trx1: dominante negativo DN-Trx1: mutante de Trx1; DOCA: deoxicorticosterona acetato ; EF: Encurtamento fracionário; eNOS: oxido nítrico sintetase, FC: frequência cardíaca ; FE: fração de ejeção; FS: fração de encurtamento; Glib: glibenclamida GMPc: monofosfato de guanosina cíclica; GSSG: níveis oxidados de glutathiona; IL-10 : interleucina 10; IL-6: interleucina; IntReox: reoxigenação intermitente; IP: intraperitoneal; ISO: Isoproterenol; L-NAME: inibidor de óxido nítrico (NO) sintetase : N omega-nitro-L-arginina; LVdp/dtmax: valores máximos da primeira derivado da pressão ventricular esquerda; LVEDD : Diâmetro diastólico final V||;LVESD: Diâmetro sistólico final d VI; MI/R: isquemia e reperfusão cardíaca; MI: infarto do miocárdio; Molsidomina: (N-etoxycarbonyl-3-(4-morpholinyl)-sydnimine), ON doador; NHE-1: antiporter 1 de sódio-hidrogênio NT-proBNP : 76 aminoácidos Fragmento terminal N do BNP ; PAM: pressão arterial média pH: pH intracelular; RhoA: membro da família Ras homólogo A; RUPP:

redução da pressão de perfusão uterina; RVW/TL: Relação peso-ventrículo direito-comprimento da tibia; SIRT1: sirtuina 1; TAPSE: excursão sistólica do plano anular tricúsplice; TGF- β : fator de crescimento transformador β ; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; TPVR: resistência vascular periférica total; TUNEL: marcação terminal por desoxinucleotidil transferase dUTP; VD: ventrículo direito; (VD/[VI+IS]): (ventrículo direito/ventrículo esquerdo + tamanho da zona infarta)]; VEGF: fator de crescimento endotelial VI: via intravenosa; VO: via oral.

Tabela 4. Efeitos anti-hipertensivo e/ou cardioprotetor do Sildenafil (SILD) em ratos (diversos modelos de doença cardiovascular)

Autor	Parâmetros avaliados				Resultados		
	país	Modelo experimental / N total	Dose de Sildenafil (Sild)/ duração do tratamento	Dose de terapia combinada		Hemodinâmica	Cardioproteção
Andersen et al., 2013	Dinamarca	Ratos Wistar Galas . BAP N = 69	100 mg/kg em água de beber 4 semanas	BAY 41 22272 (10 mg/kg) / em água de beber.	PAM e FC registrados de forma invasiva (cateter inserido na artéria carótida)	Ecocardiografia. Histologia e medida de tamanho do VD (RVW/TL). Determinação de GMPc.	Sild não inibiu hipertrofia do VD e o desenvolvimento da fibrose intersticial. A pressão sistólica do VD foi aumentada nos ratos que recebem BAY (estimulador de guanilato ciclase) e BAY + Sildenafil. O TAPSE não foi substituído por qualquer tratamento comparado com os controles. A PAM foi rebaixada no grupo BAY + Sildenafil; e aumentados os níveis de GMPc.
Wen et al., 2020	Estados Unidos	Ratos Sprague Dawley MI pós-queimadura N = 36	2 mg/kg/IP Dose única	---	---	Ecocardiografia. Histologia, expressão genética, estresse oxidativo e níveis antioxidantes e de GMPc em tecido cardíaco.	Sild aliviou mais de 90% dos depósitos de colágeno após a queimadura; normalizou os níveis de expressão mRNA dos genes RhoA ANP e BNP, colágeno I e III, ACTA(α SMA); reduziu os infiltrados inflamatórios e normalizou níveis de MDA (73,33%), e de antioxidantes.

Doghri et al., 2019	SHR Dieta cafeteria França	5mg/kg VO por gavagem 10 semanas N = 32	---	Medição de PA por Pletismografia	Langendorff; reatividade vascular; determinação de GMPc em anéis aórticos kit de ensaio imunoenzimático. Espectrofotometria	Sild reduziu significativamente a PA, o inotropismo cardíaca e melhorou a vasodilatação coronariana no grupo de dieta de cafeteria e restaurou a contratilidade cardíaca. Os níveis de GMPc não apresentaram diferença entre os grupos. Curva resposta concentração cumulativa (CCRC) para fenilefrina, no grupo de dieta hipercalórica, tratado com Sild foi significativamente deslocado para a direita quando comparado aos controles. Sild reduz o ganho de peso, melhora a vasodilatação coronariana e reduziu a vasoconstricção induzida por fenilefrina
George et al., 2013	Ratos Sprague Dawley Estados Unidos	45mg/kg água de beber 3 semanas N= 40	---	PAM e FC direta foram registrados em ratos acordados	---	Em resposta a RPPU a, PAM no 19 dia gestacional (GD19) aumentou (100± 1,6 vs. 132 ±2,7 mmHg) Sild não teve efeito na PAM nos ratos controle, mas diminuiu a pressão em ratos RUPP (115 ± 1 mmHg). O procedimento RPPU não diminuiu a massa placentária em comparação com o grupo de controle. Sild aumentou a massa placentária nos animais controle, mas não alterou o peso da placenta em RPPU.
Hassan et al., 2005	Ratos albinos Egito	0,7 mg/kg/dia IP. Modelo hipertrofia induzida por ISO 10 dias N= 54	ISO (5mg/kg/dia SC). + L-NAME (10mg/L na água de beber)	---	Níveis de troponina cardíaca e GMPc foram medidos por ELISA. Hipertrofia cardíaca: relação HW/BW. Atividade de creatina (CK) por espectrofotometria.	Coefficiente cardíaco: Grupo ISO (5,27 ± 0,17**) Grupo Sildenafil + ISO (3,75 ± 0,48*) . GMPc: Grupo ISO (4,12 ± 1,36**) Grupo ISO+ Sildenafil (10,51 ± 3,05***) CK: Grupo Sildenafil (5,80 ± 1,02**) Grupo Sildenafil + ISO + L-NAME (3,47 ± 0,37*). cTnT: Grupo ISO (6,50 ± 1,29**) Grupo Sildenafil + ISO (3,71 ± 1,16**) Grupo Sildenafil (0,75 ± 0,28*) Grupo Sildenafil+ ISO + L-NAME (6,34 ± 1,14**)

Ferreira-Melo et al., 2006 Brasil	Ratos Wistar L-NAME + Sild N = 60	45 mg/kg/dia na água de beber. 8 semanas	L-NAME (20 mg/rato/dia) na água de beber 8 semanas	PA foi medida por pletismografia e parâmetros hemodinâmicos por medida direta (cateter na artéria carótida). Sonda transônica de medidor de fluxo foi colocada na aorta ascendente.	Tamanho cardíaco: relação HW/BW. Histologia de VI (hematoxilina-eosina). As lesões do miocárdio avaliadas por método esterológico.	No grupo com hipertensão induzida por L-NAME, a PAM é reduzida pelo tratamento com Sild. O débito cardíaco não é alterado pelo Sild. Mas, quando L-NAME é associado, o débito é aumentado, embora continue mais baixo que o controle. A TPVR foi aumentada nos grupos L-NAME e Sild +L-NAME em comparação com o grupo tratado com Sild. Sild sozinho não teve efeito significativo na área da lesão cardíaca em comparação com o grupo controle. O Sild atenuou o aumento do diâmetro do cardiomiócitos causado por L-AME e, reduziu ligeiramente a espessura do músculo liso vascular em comparação com ratos controle. Sild aumentou os níveis de GMP (vs grupo controle).
Dabiré et al., 2020 França	Ratos Wistar Sorafenibe N= 12	3 mg/kg/d gavagem 4 semanas	---	PAS medida por pletismografia.	---	Sild aboliu o efeito hipertensivo do Sorafenibe com valores normalizados de PAS.
Mahmood et al. 2017 Iraque	Ratos Wistar ISO N= 36	10 mg/kg VO gavagem. 21 dias	ISO (150 mg/kg, SC.)	---	Histologia e imunohistoquímica do tecido cardíaco	ISO induziu mudanças histológicas significativas e aumento em TNF alfa e IL β, o que foi diminuído pelo pré-tratamento com Sild
Behr-Roussel et al., 2008 França	Ratos Wistar Dieta isocalórica enriquecida em frutose N= 24	20 mg/kg, SC /BID 2 x dia 3 semanas	---	Monitoramento PA e FC por radiotelemetria.	Triglicerídeos foram determinados por método colorimétrico enzimático	No modelo de hipertrigliceridemia e resistência à insulina, o tratamento com Sild diminuiu a hipertriglicemia secundária ao consumo de dieta rica em frutose . A PA não é modificada pela dieta.
Yaguas et al., 2010	SHR e WKY .	2,5 mg/kg/dia,	---	PAS foi medida por pletismografia e por medida direta.	---	Sild reduziu a PAS (175,7 ± 2,77 SHR vs 149,0 ± 3,75 SHR + Sild) e melhorou a função endotelial.

Venezuela	N= 20	VO por gavagem		Função endotelial avaliada em aorta: CCRC para PHE e Ach.			
		6 meses					
Rehse et al 1999	SHR. Trombose a laser	30 mg/kg, VO	Molsidomina (5 mg/kg)	PA foi medida por pletismografia	---	Sild diminui a PA de forma dose dependente. Sild sozinho (10 mg/kg) reduz a PA cerca de 6% o efeito combinado parece ser aditivo. RE 2047 sozinho não reduz a PA. A combinação de cada fármaco 5mg/kg reduz a PA (efeito aditivo)	
Alemanha	N= 30	Dose única	RE 2047 (5 e 10 mg/kg)				
Rossoni 2007	Ratos Wistar	0,37; 0,75; 1,5mg/kg/dia por gavagem	L-NAME (35-40 mg/kg/dia, por gavagem)	PAS e FC foram medidos por pletismografia.	GMPc e AMPc por ELISA	Sild diminuiu a PAS em todas doses utilizadas e aumentou GMPc (99 ± 13) e AMPc (707 ± 0) em 2,4 vezes e 1,8 vezes respectivamente, sobre o grupo controle correspondente. Sild , reduziu o efeito vasopressor da ANG II em 46% (P<0,05 em comparação com os controles).	
Itália	L-NAME	4 semanas	4 semanas		Isquemia e reperfusão em coração isolado: CPP e LVP foram medidos	Em ratos L-NAME, Sild diminuiu o dano de isquemia-reperfusão e a quantidade de CK e LDH foi significativamente reduzida. Sild melhorou o relaxamento dos anéis de aorta à Ach.	
	N= 72				Reatividade coronária frente ANG II foi avaliada		
					As atividades de CK e LDH foi por espectrofotométrica.		
Botha 2010	Ratos Wistar	0,7 ; 0, 05 mg/kg/IV.	---	---	Análise da função sistólica foi assegurada pela pressão ventricular esquerda max. e dP/dt por aumentos no volume do balão	Sild reduziu PAM 6 ± 2% no doador e melhorou significativamente a função sistólica e diastólica pós-dose no coração transplantado retornando aos valores basais 5 min pós-dose.	
Reino Unido.	Transplante cardíaco	Única dose				Apoptose mio-celular não foi alterada pelo pré-condicionamento com Sild.	
	TAC					Sild diminuiu significativamente a liberação de troponina na isquemia prolongada.-Não houve alteração na atividade de PKG 30 min após Sild (0,7 mg/kg)	
	I/R						

	N=40					intraventricular até 30 mmHg. Concentrações proteicas de VI por Western blot e Imuno-histoquímica cTnI plasmático por ELISA
Guimarães et al 2013	Ratos Wistar 2K1C N= 56-80	45mg/kg Dia VO, por gavagem 8 semanas	ATV 50mg/kg/ dia, por gavagem 8 semanas	PAS por pletismografia. Teor de itrito por quimioluminescência Reatividade vascular de aorta torácica. DHE para avaliar ROS.	---	O tratamento de ratos 2K1C com ATV, Sild, ou ambos induzem efeitos anti-hipertensivos semelhantes; reduzem a produção vascular de ROS e a atividade oxidase da NADPH em ratos hipertensos 2K1C. Níveis altos de nitrotirosina vascular foram encontrados em ratos 2K1C e foram atenuados por AVT e Sild.

Fonte: o autor (2021).

ACTA: é um gene que codifica para alfa actina; AMF: microscopia da força atômica; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; ANP: peptídeo natriurético atrial; ATV: Atorvastatina; BAP: bandagem da artéria pulmonar; BAX :bcl2 proteína X associada; BAY: estimulador de gaunilato cyclase (BAY 41-2272) ; Bcl-2: proteína de linfoma de células B; BID: dois vezes no dia; BNP: peptídeo natriurético cerebral; Caspase-3: cisteína ácido aspártico-protease 3; CCRC: curvas cumulativas de concentração-resposta; CH: hipóxia crônica; cTnT: Troponina cardíaca; DHE: dihidroeuclidium; DN-Trx1: dominante negativo DN-Trx1: mutante de Trx1; DOCA: deoxycorticosterona acetato ; EF: Encurtamento fracionário; eNOS: óxido nítrico sintetase; FC: frequência cardíaca ; Glib: glibenclamida; GMPc: monofosfato de guanosina cíclica; GSSG: níveis oxidados de glutatona; IL-10 : interleucina 10; IL-6: interleucina; IntReox: reoxigenação intermitente; IP: intraperitoneal; I/R: isquemia-reperfusão; ISO: Isoproterenol; L-NAME: inibidor de óxido nítrico (NO) sintetase ; N omega-nitro-L-arginina; LVdp/dtmax: valores máximos do primeiro derivado da pressão ventricular esquerda; LVEDD : Diâmetro diastólico final VI; LVEDS: Diâmetro sistólico final d VI; MI/R: isquemia e reperfusão cardíaca; MI: infarto do miocárdio; Molsidomina: (N-etoxycarbonyl-3-(4-morpholinyl)-sydnonimine), ON doador; NHE-1: antiporter 1 de sódio-hidrogênio; NT-proBNP : 76 aminoácidos Fragmento terminal N do BNP ; PAM: pressão arterial média ; PAS ; pressão arterial sistólica; pHi: pH intracelular; RhoA: membro da família Ras homólogo A; RUPP: pressão de perfusão uterina reduzida; RVW/TL: Relação peso-ventrículo direito-comprimento da tibia; Sem: semana; SILD: Sildenafil; SIRT1: sirtuina 1; TAPSE: excursão sistólica do plano anular tricúspico; TGF-β: fator de crescimento transformador β; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; TPVR: resistência vascular periférica total; TUNEL: marcação terminal por desoxinucleotidil transferase dUTP; VD: ventrículo direito; VEGF: fator de crescimento endotelial; VI: via intravenosa; VO: via oral.

REFERÊNCIAS

Alánová, P., Kolář, F., Ošťádal, B., Neckář, J., Alanova, P., Kolar, F., Ostadal, B., Neckar, J., Alánová, P., Kolář, F., Ošťádal, B., & Neckář, J. Role of NO/cGMP signaling pathway in cardiac ischemic tolerance of chronically hypoxic rats. *Physiological Research*, 64(5), 783–787. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932939>. 2015.

Andersen, A., Nielsen, J. M., Holmboe, S., Vildbrad, M. D., & Nielsen-Kudsk, J. E. The effects of cyclic guanylate cyclase stimulation on right ventricular hypertrophy and failure alone and in combination with phosphodiesterase-5 inhibition. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 62(2), 167–173. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318294a1cf>. 2013.

Behr-Roussel, D., Oudot, A., Compagnie, S., Gorny, D., Le Coz, O., Bernabe, J., Wayman, C., Alexandre, L., & Giuliano, F. Impact of a long-term Sildenafil treatment on pressor response in conscious rats with insulin resistance and hypertriglyceridemia. *American Journal of Hypertension*, 21(11), 1258–1263. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.273>, 2008.

Blanton, R. M., Takimoto, E., Lane, A. M., Aronovitz, M., Piotrowski, R., Karas, R. H., Kass, D. A., & Mendelsohn, M. E. Protein kinase γ inhibits pressure overload-induced cardiac remodeling and is required for the cardioprotective effect of Sildenafil in vivo. *Journal of the American Heart Association*, 1(5), e003731. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.003731>, 2012.

Botha, P., MacGowan, G. A., & Dark, J. H. Sildenafil citrate augments myocardial protection in heart transplantation. *Transplantation*, 89(2), 169–177. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181c42b22>, 2010.

Chau, V. Q., Salloum, F. N., Hoke, N. N., Abbate, A., & Kukreja, R. C. Mitigation of the progression of heart failure with Sildenafil involves inhibition of RhoA/Rho-kinase pathway. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 300(6), H2272-9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00654.2010>

Dabiré, H., Dramé, F., Cita, N., & Ghaleh, B. The hypertensive effect of sorafenib is abolished by Sildenafil. **Cardio-Oncology**, 6, 7. <https://doi.org/10.1186/s40959-020-00064-w>, 2020.

Dias, A. T., Rodrigues, B. P., Porto, M. L., Gava, A. L., Balarini, C. M., Freitas, F. P. S., Palomino, Z., Casarini, D. E., Campagnaro, B. P., Pereira, T. M. C., Meyrelles, S. S., & Vasquez, E. C. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. **Journal of Translational Medicine**, 12, 35. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-35>, 2014.

Doghri, Y., Chetaneau, F., Rhimi, M., Kriaa, A., Lalanne, V., Thorin, C., Maguin, E., Mallem, M. Y., & Desfontis, J.-C. Sildenafil citrate long-term treatment effects on cardiovascular reactivity in a SHR experimental model of metabolic syndrome. **PloS One**, 14(11), e0223914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223914>, 2019.

Ebrahimi, F., Shafaroodi, H., Asadi, S., Nezami, B. G., Ghasemi, M., Rahimpour, S., Hashemi, M., Doostar, Y., & Dehpour, A. R. Sildenafil decreased cardiac cell apoptosis in diabetic mice: Reduction of oxidative stress as a possible mechanism. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 87(7), 556–564. <https://doi.org/10.1139/Y09-036>, 2009.

Elrod, J. W., Greer, J. J. M., & Lefer, D. J. Sildenafil-mediated acute cardioprotection is independent of the NO/cGMP pathway. **Heart and Circulatory Physiology**, 292(1), H342-7. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00306.2006>.

Fahning, B., T Dias, A., P Oliveira, J., L Gava, A., L Porto, M., BS Gomes, I., ... & S Meyrelles, S. Sildenafil improves vascular endothelial structure and function in renovascular hypertension. **Current pharmaceutical biotechnology**, 16(9), 823-831, 2015.

Ferreira-Melo, S. E., Yugar-Toledo, J. C., Coelho, O. R., De Luca, I. M., Tanus-Santos, J. E., Hyslop, S., Irigoyen, M. C., & Moreno, H. J. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. **European Journal of Pharmacology**, 542(1–3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.04.039>, 2006.

Fisher, P. W., Salloum, F., Das, A., Hyder, H., & Kukreja, R. C. Phosphodiesterase-5 inhibition with Sildenafil attenuates cardiomyocyte apoptosis and left ventricular dysfunction in a chronic model of doxorubicin cardiotoxicity. *Circulation*, 111(13), 1601–1610. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160359.49478.C2>, 2005.

Fukuma, N., Takimoto, E., Ueda, K., Liu, P., Li, Y., Noma, K., Hiroi, Y., Liao, J. K., & Komuro, I. Endothelial estrogen non-nuclear signaling plays a key role in anti-remodeling effects via cGMP signaling in failing heart. *Circulation Research*, 125. <https://doi.org/10.1161/res.125.suppl-1.829>, 2019.

George, E. M., Palei, A. C., Dent, E. A., & Granger, J. P. Sildenafil attenuates placental ischemia-induced hypertension. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(4), R397-403. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00216.2013>.

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*, 1(1), 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.11.004>, 2013.

Hadi, N. R., Al-Amran, F., Ahmad, A. A., & Alturfi, M. The cardioprotective potential of Sildenafil in myocardial ischemia reperfusion injury. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(1), 273–281. <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L607914363&from=export>, 2016.

Hassan, M. A. H., & Ketat, A. F. Sildenafil citrate increases myocardial cGMP content in rat heart, decreases its hypertrophic response to isoproterenol and decreases myocardial leak of creatine kinase and troponin T. *BMC Pharmacology*, 5, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-5-10>, 2005.

Kolettis, T. M., Kontaras, K., Spartinos, I., Maniotis, C., Varnavas, V., Koutouzis, M., Mourouzis, I., Papalois, A., Pantos, C., & Kyriakides, Z. S. Dose-dependent effects of Sildenafil on post-ischaemic left ventricular function in the rat isolated heart. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(3), 346–351. <https://doi.org/10.1211/jpp.62.03.0009>, 2010.

- Koneru, S., Penumathsa, S., Thirunavukkarasu, M., Pant, R., Vidavalur, R., Zhan, L., Otani, H., Das, D. K., & Maulik, N. Sildenafil mediated neovascularization leads to cardioprotection in rat in vivo myocardial ischemia reperfusion model: Role of VEGF and Ang-1. **Circulation**, 114(18, S), 229, 2006.
- Lee, K. H., Kwon, S. J., Woo, J.-S., Lee, G.-J., Lee, S.-R., Jang, H.-H., Kim, H. S., Kim, J. W., Park, H. K., Cho, K. S., & Kim, W. Effects of Sildenafil on nanostructural and nanomechanical changes in mitochondria in an ischaemia-reperfusion rat model. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, 41(10), 763–768. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12290>, 2014.
- Lee, T.-M., Chen, C.-C., Chung, T.-H., & Chang, N.-C. Effect of Sildenafil on ventricular arrhythmias in post-infarcted rat hearts. **European Journal of Pharmacology**, 690(1–3), 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.015>, 2012.
- Li, N., Yuan, Y., Li, S., Zeng, C., Yu, W., Shen, M., Zhang, R., Li, C., Zhang, Y., & Wang, H. PDE5 inhibitors protect against post-infarction heart failure. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, 21, 1194–1210. <https://doi.org/10.2741/4450>, 2016.
- Mahmood, A. M., Al-Abbassi, M. G., Al-Obeidy, M. M., & Qasim, B. J. Histological and immunohistochemical study of cardio protective effect of Sildenafil against isoproterenol induced cardiotoxicity in male rats. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, 42(1), 144–150. <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L614344288&from=export>, 2017.
- Milano, G., Bianciardi, P., Rochemont, V., Vassalli, G., Segesser, L. K. von, Corno, A. F., Guazzi, M., & Samaja, M. Phosphodiesterase-5 inhibition mimics intermittent reoxygenation and improves cardioprotection in the hypoxic myocardium. **PLoS One**, 6(11), e27910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027910>, 2011.
- Nio, Y., Ookawara, M., Yamasaki, M., Hanauer, G., Tohyama, K., Shibata, S., Sano, T., Shimizu, F., Anayama, H., Hazama, M., & Matsuo, T. Ameliorative effect of phosphodiesterase 4 and 5 inhibitors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive uni-nephrectomized KKAy mice. **FASEB Journal**, 34(11), 14997–15014. <https://doi.org/10.1096/fj.202001084R>, 2020.

Patrucco, E., Domes, K., Sbroggió, M., Blaich, A., Schlossmann, J., Desch, M., Rybalkin, S. D., Beavo, J. A., Lukowski, R., & 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 of the United States of America*, 111(35), 12925–12929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414364111>, 2014.

Pérez, N. G., Piaggio, M. R., Ennis, I. L., Garcarena, C. D., Morales, C., Escudero, E. M., Cingolani, O. H., De Cingolani, G. C., Yang, X.-P., & Cingolani, H. E. Phosphodiesterase 5A inhibition induces Na⁺/H⁺ exchanger blockade and protection against myocardial infarction. *Hypertension*, 49(5), 1095–1103. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.087759>, 2007.

Rehse, K., Scheffler, H., & Reitner, N. Interaction of Viagra with the NO donors molsidomine and RE 2047 with regard to antithrombotic and blood pressure lowering activities. *Archiv Der Pharmazie*, 332(5), 182–184. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4184\(19995\)332:5<182::AID-ARDP182>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4184(19995)332:5<182::AID-ARDP182>3.0.CO;2-Z), 1999.

Roberts, R. P., Refuerzo, J. S., Ferrari, F., Ontiveros, A. E., Tamayo, E. H., Sibai, B. M., Blackwell, S. C., & Longo, M. Sildenafil treatment in a nonsevere hypertensive murine model lowers blood pressure without reducing fetal growth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 215(3), 386.e1-386.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.05.002>, 2016.

Rosanio, S., Ye, Y., Atar, S., Rahman, A. M., Freeberg, S. Y., Huang, M.-H., Uretsky, B. F., & Birnbaum, Y. Enhanced cardioprotection against ischemia-reperfusion injury with combining Sildenafil with low-dose atorvastatin. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 20(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s10557-005-5203-4>, 2006.

Rossoni, G., Manfredi, B., De Gennaro Colonna, V., Berti, M., Guazzi, M., & Berti, F. Sildenafil reduces L-NAME-induced severe hypertension and worsening of myocardial ischaemia-reperfusion damage in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 150(5), 567–576. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707131>, 2007.

Salloum, F. N., Abbate, A., Das, A., Houser, J.-E., Mudrick, C. A., Qureshi, I. Z., Hoke, N. N., Roy, S. K., Brown, W. R., Prabhakar, S., & Kukreja, R. C. Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice. *American Journal of Physiology-heart and Circulatory Physiology*, 294(3), H1398–H1406. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.ajpheart.91438>, 2007.

Salloum, F. N., Das, A., Thomas, C. S., Yin, C., & Kukreja, R. C. Adenosine A(1) receptor mediates delayed cardioprotective effect of Sildenafil in mouse. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 43(5), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.08.014>, 2007.

Salloum, F., Yin, C., Xi, L., & Kukreja, R. C. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. *Circulation Research*, 92(6), 595–597. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000066853.09821.98>, 2003.

Sasaki, H., Nagayama, T., Blanton, R. M., Seo, K., Zhang, M., Zhu, G., Lee, D. I., Bedja, D., Hsu, S., Tsukamoto, O., Takashima, S., Kitakaze, M., Mendelsohn, M. E., Karas, R. H., Kass, D. A., & Takimoto, E. PDE5 inhibitor efficacy is estrogen dependent in female heart disease. *Journal of Clinical Investigation*, 124(6), 2464–2471. <https://doi.org/10.1172/JCI70731>, 2014.

Shalwala, M., Zhu, S.-G., Das, A., Salloum, F. N., Xi, L., & Kukreja, R. C. Sirtuin 1 (SIRT1) activation mediates Sildenafil induced delayed cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in mice. *PloS One*, 9(1), e86977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086977>, 2014.

Takimoto, E., Koitabashi, N., Hsu, S., Ketner, E. A., Zhang, M., Nagayama, T., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Blanton, R., Siderovski, D. P., Mendelsohn, M. E., & Kass, D. A. Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(2), 408–420. <https://doi.org/10.1172/JCI35620>, 2009.

Wang, X., Fisher, P. W., Xi, L., & Kukreja, R. C. Essential role of mitochondrial Ca²⁺-activated and ATP-sensitive K⁺ channels in Sildenafil-induced late cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(1), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.10.006>, 2008.

Wen, J. J., Cummins, C., & Radhakrishnan, R. S. Sildenafil recovers burn-induced cardiomyopathy. *Cells*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/cells9061393>, 2020.

Wu, J.-R., Kao, L.-P., Wu, B.-N., Dai, Z.-K., Wang, Y.-Y., Chai, C.-Y., & Chen, I.-J. Buffered l-ascorbic acid, alone or bound to KMUP-1 or Sildenafil, reduces vascular endothelium growth factor and restores endothelium nitric oxide

synthase in hypoxic pulmonary artery. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 31(5), 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2015.02.005>, 2015.

Yaguas, K., Bautista, R., Quiroz, Y., Ferrebuz, A., Pons, H., Franco, M., Vaziri, N. D., & Rodriguez-Iturbe, B. Chronic Sildenafil Treatment Corrects Endothelial Dysfunction and Improves Hypertension. *American Journal of Nephrology*, 31(4), 283–291. <https://doi.org/10.1159/000279307>, 2010.

Zaobornyj, T., Mazo, T., Perez, V., Gomez, A., Contin, M., Tripodi, V., D'Annunzio, V., & Gelpi, R. J. Thioredoxin-1 is required for the cardioprotective effect of Sildenafil against ischaemia/reperfusion injury and mitochondrial dysfunction in mice. *Free Radical Research*, 53(9–10), 993–1004. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1661404>, 2019.