

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO DO USO DA TADALAFILA, INIBIDOR DA
FOSFODIESTERASE TIPO 5, NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO
RENAL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS**

**Cláudio Miguel Pinto Morales
Orientador: Dr. Ernani Luis Rhoden**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2010

M828e Morales, Cláudio Miguel Pinto

Efeito do uso da tadalafila, inibidor da fosfodiesterase tipo 5, na isquemia-reperfusão renal: estudo experimental em suínos / Cláudio Miguel Pinto Morales ; orient. Ernani Luis Rhoden. – 2010.

51 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Traumatismo por reperfusão 2. Rim 3. Inibidores de fosfodiesterase 4. Nefropatias 5. I. Rhoden, Ernani Luis II. Título.

NLM: WJ 300

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EFEITO DO USO DA TADALAFILA, INIBIDOR DA
FOSFODIESTERASE TIPO 5, NA ISQUEMIA-REPERFUSÃO
RENAL: ESTUDO EXPERIMENTAL EM SUÍNOS**

Cláudio Miguel Pinto Morales

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas, sob orientação do Prof. Dr. Ernani Luis Rhoden.

Porto Alegre, 2010

DEDICATÓRIA

À memória de meu pai Julio Morales, ser humano simples, mas intenso em bondade, honestidade e retidão, exemplo que me norteia.

À memória de minha mãe Cleonice, pela lucidez, inteligência e cultura que me transmitiu.

À minha companheira Giana, pelo amor, pelo incentivo, pelo companheirismo, pelo apoio nas horas difíceis, bem como pela sua compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Ernani Rhoden pela transmissão do conhecimento, pelo exemplo de produção científica e pelo apoio na realização desta pesquisa.

Ao Dr. Claudio Luis Martins Lima, urologista, preceptor na minha residência, que, com seu exemplo, ajudou a nortear meu caminho profissional e pessoal.

Ao Dr. Mirandolino Mariano pelo incentivo, força, exemplo e ensinamentos.

Ao Dr. Maurício Veloso Brum pelo incentivo, ajuda e amizade.

Aos alunos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, João Pedro Scussel Feranti, Fabiane Reginatto dos Santos, Gustavo Brambatti, Fernando Variani Tomazzoni, Wilian Andelieri, Manoel Pedro Bueno, pelo trabalho excelente durante a realização dos procedimentos, o que foi fundamental para os resultados obtidos.

Às médicas veterinárias Micheli Westphal Ataíde, Marinês Bortoluzzi e Marília Teresa de Oliveira, também pelo excelente trabalho exercido durante os procedimentos realizados no Hospital Veterinário da UPF.

À Biomédica Grazielle Halmenschlager pela ajuda, a qual foi fundamental na finalização deste trabalho.

Ao Dr. Rubens Rodriguez, do Instituto de Patologia de Passo Fundo, pelo excelente trabalho realizado com amizade e com precisão científica.

Ao Dr. Hugo Lisboa pela preocupação e pelo interesse com a conclusão do trabalho.

À Dra. Maria Isabel Edelweiss pela paciência, pela compreensão e pela confiança dispensada, permitindo a realização deste sonho.

Ao meu colega urologista Marcelo Pimentel que segurou a barra do dia a dia no consultório e no Bloco Cirúrgico para que pudesse escrever esta dissertação.

Às minhas filhas Julia, Marina e Paula pela compreensão para com a minha ausência do convívio familiar durante a realização deste projeto.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da tadalafila, um inibidor da fosfodiesterase tipo 5, nos valores teciduais renais de malondialdeído (produto da lipoperoxidação celular), nos níveis séricos de uréia e creatinina e na histologia renal em suínos submetidos à isquemia-reperfusão renal em rim único.

Material e métodos: Doze suínos Large-White foram submetidos à uninefrectomia seguida por isquemia-reperfusão renal contralateral e separados aleatoriamente em dois grupos com ou sem tratamento com tadalafila 20 mg via oral. Foram analisados os resultados de lipoeroxidação, histologia e função renal.

Resultados: Os valores teciduais de Malondialdeído (MDA) foram significativamente superiores no grupo não tratado com tadalafila ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo de animais tratados com o fármaco. Houve diferença estatística nos estudos histológicos, tendo ocorrido mais vacuolização e infiltrado polimorfonuclear intersticial no grupo não tratado com tadalafila. Não houve diferença significativa nas dosagens séricas de uréia e creatinina.

Conclusão: Nosso estudo sugere, pela primeira vez na literatura, que a tadalafila tem um efeito protetor na isquemia e reperfusão renal em suínos, como evidenciado pelos resultados da lipoperoxidação e pelos estudos histológicos.

Palavras-chave: tadalafila, rim, isquemia, malondialdeído, lipoperoxidação, inibidor da fosfodiesterase, óxido nítrico

SUMÁRIO

1 LISTA DE ABREVIATURAS.....	07
2 INTRODUÇÃO.....	09
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1 Isquemia-reperfusão renal.....	12
3.1.1 Espécies ativas de oxigênio (EAO).....	14
3.1.2 Papel do óxido nítrico na isquemia-reperfusão.....	21
3.1.3 Papel da mitocôndria na isquemia-reperfusão.....	22
3.2 Inibidores da fosfodiesterase tipo 5.....	24
4 OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo geral	
4.2 Objetivos específicos	
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	27
6 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS.....	33

1 LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfatada

AMP – adenosina monofosfatada

ANT – adenina nucleotidio

ATP - Adenosina trifosfato

CAT - catalase

Ca⁺⁺ - cálcio

Cu⁺⁺ - cobre

DNA – ácido desoxirribonucleico

EAO - espécies ativas de oxigênio

ET1 – endotelina-1

EDRF - fator de relaxamento endotelial derivado

FDA – Food and Drugs Administration

Fe⁺⁺ - ferro

GMPc - guanosina 3,5 monofosfato cíclica

GSH – glutathiona reduzida

GSH-Px – glutathiona peroxidase

GSH-Rd – glutathiona redutase

GSSG - glutationa oxidada

H⁺ - próton

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HOCl - ácido hipocloroso

IL-1 - interleucina 1

IL-2 - interleucina 2

I-R – isquemia-reperfusão

IRR – isquemia-reperfusão renal

LPO – lipoperoxidação

MDA - malondialdeído

NAD - nicotinamida adenina

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida

NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotide fosfato oxidase

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintetase

PAF – fator de agregação plaquetária

PDE 5 - fosfodiesterase 5

PG12 - prostaglandina

ONOO⁻ - peroxinitrito

·OH – radical hidroxil

·O₂⁻ - radical superóxido

SOD – superóxido dismutase

TBARS – ácido tiobarbitúrico

2 INTRODUÇÃO

A isquemia-reperfusão renal (IRR) é um fenômeno complexo que envolve vários mecanismos fisiopatológicos, tais como a vasoconstrição renal, o dano tubular extenso e a lesão glomerular. Esta situação clínico-cirúrgica é um evento presente em transplantes renais, revascularizações cirúrgicas das artérias renais, nefrectomias parciais, nefrolitotomias, entre outros (1).

Inicialmente, seguindo-se a isquemia, ocorre a vasoconstrição, a anóxia, a ativação das células endoteliais, o edema tubular, a necrose do epitélio tubular, o edema intersticial, o influxo celular de cálcio, a depleção do trifosfato de adenosina (ATP). Após, a reperfusão incrementa a expressão de moléculas de adesão, promove ativação leucocitária, dando início a uma produção aumentada de espécies ativas de oxigênio (EAO) e ao desenvolvimento do processo inflamatório e subsequente disfunção mitocondrial (2, 3). Contudo, a evidência de quais os mecanismos que, finalmente, tornam irreversível a morte celular não é clara e permanece como fonte inesgotável de pesquisas.

A duração e a severidade do fenômeno isquêmico-reperfusional são elementos importantes que determinam a reversibilidade ou não da injúria celular. Períodos curtos de isquemia e de reperfusão podem lesar temporariamente a célula e esta vir a recuperar-se, já em períodos longos, pode ocorrer a morte celular. Portanto, o conhecimento dos mecanismos de proteção e de injúria celular no fenômeno isquêmico-reperfusional é de fundamental importância para a prática clínica e cirúrgica (4, 5, 6).

A reperfusão desencadeia uma produção aumentada de espécies ativas de oxigênio e o desenvolvimento do processo inflamatório. Este processo contribui para a injúria renal, observada em órgãos doados em transplantes. A isquemia-reperfusão, no transplante de

cadáver, pode causar necrose tubular aguda e retardo no início da função do enxerto, e foi correlacionada à rejeição aguda em várias séries (2).

As EAO originam-se no período perfusional, em consequência de uma inadequada metabolização do oxigênio molecular. Atuam diretamente sobre os ácidos graxos dos fosfolípidos das membranas celulares, ou indiretamente através de radicais lipídicos peroxidados, ou ainda por meio de produtos da fragmentação lipídica (9, 10). Estes eventos ocorrem de forma sequencial e amplificada, determinando uma reação em cadeia para produzir espécies radicais, culminando com um efeito destrutivo sobre as células vizinhas (3, 7, 8, 9, 11).

Nesse sentido, estas espécies radicais afetam a membrana celular, os constituintes intracelulares, como as membranas das organelas citosólicas, as mitocondriais e os lisossomas. Por sua vez, as mitocôndrias que, normalmente, são envoltas por membranas, além de serem vulneráveis a tal ação oxidativa, funcionam como uma contínua fonte de geração de EAO através do mecanismo denominado de cadeia de transporte de elétrons, e a ruptura da barreira mecânica imposta pela sua membrana permite o extravasamento de espécies radicais para o meio citosólico (9, 10, 13, 14).

O óxido nítrico (NO) parece ser peça chave entre a injúria da isquemia-reperfusão (I-R) e a taxa de recuperação tecidual. Óxido nítrico, uma versátil molécula mensageira intercelular associada à vasodilatação e à neurotransmissão, está também envolvida no processo inflamatório, na lesão tecidual e na defesa celular. Têm sido demonstrado que a produção de NO está aumentada no rim pós I-R (2, 15). A atividade da NO sintetase endotelial (eNOS) predomina nos efeitos benéficos do NO na recuperação da lesão de isquemia-reperfusão de rins transplantados. Entre os efeitos benéficos do NO endógeno na isquemia-reperfusão renal podemos elencar os seguintes: a inibição da adesão e da agregação plaquetária através do aumento dos níveis do GMP cíclico (cGMP), evitando assim trombose vascular no período reperfusional; o bloqueio da aderência e migração monocitária; a inibição da ativação leucocitária que leva a adesão neutrofílica-endotelial e a geração de EAO; a inibição da liberação de produtos com ação citotóxica e vasoconstritora (leucotrienos, citocinas e prostaglandinas); a sua ação direta contra a expressão de moléculas de adesão celular e geração de EAO; e a sua ação vasodilatadora que interfere na microcirculação após a reperfusão e pode ter efeito citoprotetor direto sobre o endotélio durante a reação inflamatória (2, 16).

Tais mecanismos justificam a importante função que o NO tem na regulação hemodinâmica e funcional do rim. Evidências sugerem que o NO não é gerado apenas no endotélio vascular renal, mas também em outras células renais, como o mesângio, a mácula densa e as células tubulares, indicando com isso que o NO endógeno tem um papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo, da pressão de perfusão, do tônus vascular renal, da reabsorção tubular e na taxa de filtração glomerular (17, 18).

Entretanto, supõe-se que o NO tenha um papel ambíguo no fenômeno isquêmico-reperfusional, ou seja, durante o período isquêmico ele parece proteger o tecido devido às suas propriedades vasodilatadoras e à sua ação moduladora na agregação leucocitária endotelial, reduzindo o acúmulo dos leucócitos no local conflagrado pelo processo inflamatório. Contudo, durante o período de re-oxigenação do tecido previamente isquêmico, o NO poderia reagir com moléculas instáveis de oxigênio (EAO), tais como o radical superóxido, funcionando, por um lado, como *scavenger*, neutralizando sua atividade; e, por outro lado, originando o peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente instável e com alto poder oxidativo, causando, por conseguinte, peroxidação lipídica ao nível dos ácidos graxos das membranas fosfolipídicas celulares (7, 19).

Os efeitos deletérios da isquemia-reperusão sobre os rins podem ser avaliados por meio de vários métodos que incluem a avaliação funcional, determinação dos produtos finais da ação oxidativa sobre os componentes lipídicos das membranas celulares e, também, através de estudos histológicos (7, 20, 21).

Mecanismos, que protejam o rim do dano tecidual provocado pela isquemia e reperusão, estão sendo foco de estudos devido à prevalência desta situação, como referido anteriormente, em diversas situações da prática clínico-cirúrgica diária (22, 23, 24, 25, 26, 27).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Isquemia-reperfusão renal

Com o intuito de manter a arquitetura e os processos metabólicos que dependem de sua integridade, a célula é envolta por membranas lipoproteicas (membrana celular). Assim, também o são, o citoplasma (membrana citoplasmática), o núcleo (membrana nuclear) e as organelas intracitoplasmáticas. São denominadas lipoproteicas porque são constituídas por duas camadas de lipídios e no seu interior por moléculas proteicas (28, 29).

Os lipídios constituem uma barreira ao livre movimento da água de um compartimento celular para outro, enquanto as moléculas proteicas interrompem esta barreira, proporcionando vias de passagem para várias substâncias, além de exercerem funções enzimáticas essenciais à vida celular. Portanto, além da estrutura individualizada e bem definida de cada unidade celular, vários processos metabólicos ocorrem tanto para manter a arquitetura celular como para manter a atividade funcional específica da célula em determinado órgão (28, 29).

A célula, para executar as suas funções depende de energia, sob a forma de adenosina trifosfatada (ATP) e diversos mecanismos metabólicos estão envolvidos nos processos de geração da mesma. O ATP é uma combinação de adenina, ribose e três radicais fosfato, unindo-se os dois últimos radicais restantes da molécula por meio de ligações de grande energia. Após a perda de um radical fosfato do ATP, o composto torna-se adenosina difosfatada (ADP) e, depois da perda do segundo radical fosfato, o mesmo passa a ser adenosina monofosfatada (AMP). Além disso, diferentes processos metabólicos, como o ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs), o ciclo das pentoses, a

fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte de elétrons, entre outros, são importantes fontes geradoras de energia celular (28).

Especificamente no nível renal, a isquemia é uma causa comum de insuficiência renal aguda. O dano advindo desta é caracterizado por um decréscimo no fluxo sanguíneo renal, pela diminuição da taxa de filtração glomerular e do coeficiente de ultrafiltração capilar glomerular. Além disso, ocorre uma significativa disfunção tubular, decorrente da obstrução dos túbulos renais por células e debris, refluxo retrógrado intersticial do filtrado glomerular, ambos decorrentes do dano epitelial tubular. Logo, estes aspectos podem ser sumarizados em uma entidade clínica denominada de necrose tubular aguda, a qual embora reversível apresenta efeitos deletérios a longo prazo e a insuficiência renal crônica pode, eventualmente, ocorrer (30).

Quando as células são submetidas à hipóxia, a depleção de ATP diminui a atividade da Na, K-ATPase. A consequência é uma queda no pH intracelular e um aumento do cálcio intracelular. Um dos mediadores-chaves da injúria causada pela hipóxia nas células renais epiteliais é o cálcio intracelular. Este ativa proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintetases (NOS) e endonucleases, que por seu turno rompem a arquitetura celular, danificam proteínas e membranas celulares e degradam o DNA (30, 31, 32). Cita-se que as concentrações citoplasmáticas elevadas de cálcio podem ser um dos fatores que disparam uma série de eventos bioquímicos, entre os quais, destaca-se, a ativação de proteases cálcio-dependentes que, atuando sobre a xantina desidrogenase, convertem-se em sua forma oxidase (Tipo O). Em culturas de células dos túbulos renais proximais, o dano induzido por hipóxia celular pode ser diminuído por bloqueadores do canal de cálcio, queladores de cálcio intracelular e proteínas ligadoras de cálcio (31, 33, 34, 35).

A microcirculação sanguínea representa o primeiro sítio da ação deletéria do fenômeno isquêmico reperfusional. Durante a isquemia, fosfatos energizados são depletados e o transporte de íons através da membrana celular é reduzido, o que leva ao acúmulo intracelular de íons acompanhado de um influxo de água, resultando em edema celular, em especial das células endoteliais. A consequente perda de fluidos intravasculares resulta em uma hemoconcentração local e em um aumento da viscosidade sanguínea que, posteriormente, é ainda mais exacerbada pela mobilização leucocitária. A repleção capilar por neutrófilos; a digestão proteolítica da membrana basal endotelial pela migração leucocitária (aumentando a permeabilidade vascular); a micro-trombose intravascular e a vasoconstrição microvascular pela não liberação de prostaglandinas (PGI), adenosina e

óxido nítrico envolvidos na modulação do tônus vascular tornam o restabelecimento do fluxo sanguíneo microvascular, no período reperfusional, mais difícil, levando ao fenômeno denominado de “não reperfusão”. O efeito do mesmo tem como implicações um prolongamento do período isquêmico e suas consequências. Muitos fatores têm sido propostos para explicar este fenômeno, tais como: um desequilíbrio entre vasodilatadores e vasoconstritores, congestão endotelial, edema intersticial devido ao aumento da permeabilidade endotelial que comprime os capilares peritubulares, aumentada aderência leucocitária e o acúmulo extravascular de leucócitos. Embora a reperfusão de tecidos isquêmicos seja essencial para a sobrevivência dos mesmos, esta se acompanha de um dano adicional àquele iniciado pela isquemia (“reperfusão paradoxal”). Enquanto o fenômeno de “não perfusão” envolve os capilares, a “reperfusão paradoxal” está associada à adesão leucocitária, às superfícies endoteliais das vênulas pós-capilares e à subsequente ativação leucocitária, um processo que danifica a integridade celular do endotélio, permitindo o extravasamento de macromoléculas do espaço intra para o extravascular (31, 33, 36).

Sob injúria hipoxêmica, a depleção de ATP causa disfunção mitocondrial e acúmulo intracelular de sódio, cálcio e espécies ativas de oxigênio. Subsequentemente, múltiplas enzimas, incluindo proteases, óxido nítrico sintetases, fosfolipases e endonucleases são ativadas e protagonizam uma ruptura na arquitetura celular e nas membranas celulares, com degradação de DNA e eventualmente morte celular. Isquemia-reperfusão também ativa o complemento, citocinas que são citotóxicas e atraem leucócitos para a área isquêmica para causar posterior dano celular. A lesão do endotélio vascular prolonga a isquemia e induz congestão vascular, edema e posterior infiltração de células inflamatórias (30, 37, 38).

3.1.1 Espécies ativas de oxigênio

As espécies ativas de oxigênio (EAO) têm sido referidas como tendo envolvimento significativo nos mecanismos de dano tecidual associados ao fenômeno isquêmico-reperfusional. Este aspecto é salientado pela observação de que a isquemia é referida, em certas circunstâncias, como menos lesiva aos tecidos do que a reperfusão, nas quais um

grande aporte de oxigênio ocorre depois de restabelecida a circulação arterial, o que leva a um incremento na produção das EAO e suas consequências (7, 39).

As EAO danificam as membranas celulares através da peroxidação de ácidos graxos no interior da estrutura dos fosfolípidos, elementos fundamentais da arquitetura das membranas celulares lipoproteicas. Durante este processo, radicais peróxidos dos lipídios, hidroperóxidos de lipídios e outros produtos da fragmentação dos mesmos são agentes oxidativos ativos. Dessa maneira, a reatividade do radical livre tem uma tendência para gerar reações em cadeia e para produzir espécies radicais ativas que terminam com efeitos destrutivos sobre as células (9).

Os mecanismos propostos como responsáveis pela geração das EAO, sob estas circunstâncias, incluem a lesão mitocondrial, a atividade de xantina oxidase, a via do ácido araquidônico, o óxido nítrico ou o acúmulo de polimorfonucleares teciduais (2, 3, 9, 11, 40).

As espécies ativas de oxigênio (EAO) têm um papel preponderante no fenômeno isquêmico reperfusional, notadamente no período reperfusional, com a reintrodução do oxigênio molecular ao tecido previamente isquêmico. As EAO assim geradas são citotóxicas devido à sua capacidade de reagir e de danificar as células por meio de uma ação ao nível da membrana celular e ácidos nucleicos, resultando em uma severa disfunção e morte celular. Aspecto de extrema importância é a propriedade das EAO em reagir aos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos das membranas celulares, resultando na formação de hidroperóxidos que, por sua vez, inibem uma série de sistemas enzimáticos (10, 11, 40).

A ação direta das EAO ao nível do endotélio também ocorre promovendo e estendendo o processo inflamatório, tornando a ativar a reação endotelial e reiniciando o processo. A enzima xantina-oxidase apresenta uma participação significativa na produção destas EAO em nível endotelial. A forma nativa da enzima xantina oxidase é a enzima xantina desidrogenase (tipo D), enzima esta que utiliza a nicotinamida adenina (NAD) como aceptor de elétrons e, portanto, não possui capacidade de gerar EAO. Nas situações de isquemia, hipóxia ou qualquer estado de baixo nível energético a forma tipo D é convertida na forma tipo O, enzima que utiliza o oxigênio como aceptor de elétrons e, desse modo, capaz de gerar ânions superóxidos. Nestas situações, ocorre um decréscimo do conteúdo de ATP, que na tentativa de manter a atividade energética da célula, é

catabolizado em adenosina difosfatada (ADP), adenosina monofosfatada (AMP), inosina e, finalmente, em hipoxantina, que compõe substrato para a ação da xantina desidrogenase-oxidase (3, 40).

O termo radical livre significa qualquer átomo ou molécula que tenha em sua órbita mais externa um ou mais elétrons não-pareados. O não emparelhamento de elétrons na última camada confere alta reatividade aos átomos e moléculas, pois eles têm uma forte tendência a doar ou a receber elétrons (11).

Nos seres vivos de metabolismo aeróbico, no interior da mitocôndria, o oxigênio sofre redução tetravalente, recebendo quatro elétrons, formando duas moléculas de água através da enzima citocromo oxidase. Radicais de oxigênio são produzidos endogenamente, sob condições normais, e os níveis aumentam em condições de *stress* oxidativo. O mecanismo de formação das EAO seria baseado no fato da enzima xantina oxidase utilizar o oxigênio molecular (O₂) como um aceptor de elétrons, formando assim o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). O radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) assim formado segue rotas metabólicas destinadas à formação de outros radicais (11, 40).

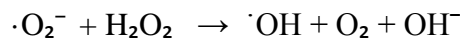
Os radicais de oxigênio mais comuns são o superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$). Enquanto os ânions superóxido e o radical hidroxil são mais reativos, o peróxido de hidrogênio, que não possui estrutura química de um radical, é mais permeável às membranas. Várias enzimas localizadas na membrana plasmática, no citoplasma e nas mitocôndrias geram radicais de oxigênio (11, 14, 40).

O radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) é formado quando o O₂ sofre a redução univalente. Isoladamente, esse radical é pouco reativo e, portanto, não é altamente citotóxico. Porém, os efeitos deletérios vêm da habilidade deste em gerar radicais secundários, extremamente tóxicos como o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), apesar de não ser um radical livre, pois não tem elétrons desemparelhados na última camada, é importante porque participa das reações que produzem o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), seja via reação de Fenton ou de Haber-Weiss. Tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas e pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro. Por esse motivo, há uma tendência atual de se chamar de “espécies ativas do oxigênio” ao invés de radicais livres do oxigênio o conjunto de substâncias envolvidas nessas reações. O radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é um dos mais reativos e é capaz de retirar átomos de hidrogênio do grupo metileno de ácidos graxos poliinsaturados, dando início à peroxidação lipídica que acaba

provocando a lise da membrana celular (lipoperoxidação). Este radical pode ser formado *in vivo* através de reações de íons de metais de transição (Fe⁺⁺) com peróxido de hidrogênio, por meio da reação de Fenton e de Haber-Weiss (11, 40).



Reação de Fenton: mecanismo de geração do potente radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) através da reação radical H_2O_2 com metais de transição como o íon ferroso e cuproso.



Reação de Haber-Weiss: demonstra a interação entre o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), numa reação catalisada por metais de transição, como, por exemplo, o ferro da hemoglobina, originando o potente radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), o oxigênio molecular (O_2) e a hidroxila (OH^-)

Durante o período de isquemia, o ATP é catabolizado até a hipoxantina, que se acumula nos tecidos. Como resultado do estado de baixa energia, há falência da homeostase celular caracterizada pela perda do gradiente iônico através da membrana celular, permitindo o influxo de Ca^{++} para as células, que ativa a protease a converter a xantina desidrogenase em xantina oxidase. A hipoxantina é o primeiro substrato para a oxidação pela xantina oxidase, o que ocorre quando o segundo substrato, o oxigênio, é fornecido na reperfusão, formando as espécies reativas do metabolismo do oxigênio (9, 40).

Outra origem dos radicais livres seria a produção de radicais superóxidos pela quebra de elétrons do sistema de transporte dos mesmos dentro da mitocôndria ou pela via da ciclooxigenase do metabolismo do ácido araquidônico. Por esse último mecanismo, haveria a ativação de proteases e fosfolipases inespecíficas induzida pelo acúmulo de cálcio intracelular no período de reperfusão, que levaria à síntese de mediadores pró-inflamatórios: o fator de agregação plaquetária (PAF) e os compostos eicosanóides (leucotrienos, tromboxane e prostaglandinas) (3, 14, 40).

A interação neutrófilo-célula endotelial seria a responsável pela liberação dos mediadores pró-inflamatórios que desencadeariam a lesão inflamatória da reperfusão e ativaria o neutrófilo a produzir o ânion superóxido, através da oxidação do NADPH a NADP. Além disso, as mieloperoxidases (localizadas nos grânulos dos neutrófilos) poderiam converter H_2O_2 em ácido hipocloroso (HOCl), também extremamente tóxico para os tecidos. Os metabólitos do ácido araquidônico, além de agirem como quimiotáticos, favoreceriam a interação neutrófilo-célula endotelial, ativariam neutrófilos a produzirem mais radicais livres de oxigênio e enzimas proteolíticas, bem como afetariam o fluxo sanguíneo pela ação direta na microcirculação. Os neutrófilos, além de aderirem à célula endotelial provocando lesão, poderiam se acumular na microcirculação (*plugging*), levando a uma obstrução do fluxo sanguíneo, fenômeno conhecido como *no reflow*, ou seja, dificuldade para restaurar a perfusão adequada da microcirculação, após a isquemia e reperfusão (36, 41, 42).

Outro radical livre, intimamente envolvido com a lesão de isquemia e reperfusão, é o gás solúvel de radical livre, óxido nítrico (NO). Conhecido, inicialmente, como fator relaxante derivado do endotélio e, posteriormente, constatado que tratava-se do NO. Segundo Moncada et al., seria produzido pelas células endoteliais, macrófagos e por neurônios centrais específicos e sintetizado a partir da L-arginina, O_2 e NADPH por meio da enzima NO sintetase (NOS), que é ativada pelo aumento do influxo de cálcio no interior da célula. Fisiologicamente, atua mantendo o tônus vascular, inibe a agregação plaquetária e a adesão dos neutrófilos e plaquetas ao endotélio vascular. Além disso, o NO, por ser um radical livre, é citotóxico para certos microorganismos e para células tumorais. Paralelamente, o NO reage com o radical superóxido, resultante da isquemia e reperfusão, dando origem via ânion peroxinitrito (ONOO⁻) ao dióxido de nitrogênio e ao altamente reativo radical hidroxila (12, 32).

O efeito mais lesivo dos radicais livres é a peroxidação lipídica da membrana. Este é um fenômeno complexo, iniciado pela abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno posicionado entre duas bandas insaturadas na molécula lipídica, formando um novo radical livre lipídico com carbono central, que na presença de oxigênio resulta em peróxidos lipídicos ou lipoperóxidos. Reações à distância com efeitos biológicos podem ocorrer quando um radical livre reage com um composto não-radical formando outro radical livre, induzindo sucessivamente reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO) (7, 11, 43).

Estas reações acontecem em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No primeiro, a EAO promove um ataque a uma molécula orgânica (ex.: ácidos graxos da cadeia lateral de lipídios), retirando um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Isto leva a formação de um radical centrado no carbono (-CH-), que tende a se estabilizar, por rearranjo molecular, formando um dieno conjugado que, por sua vez, ao se combinar com oxigênio, produz lipídios peróxidos (radical peroxil). No segundo estágio, a propagação, os radicais peroxil podem retirar hidrogênio de outra molécula lipídica, originando novos radicais reativos, ou se combinar com átomos de hidrogênio, produzindo lipídios hidroperóxidos. Estes últimos sofrem a fase de terminação, na qual pela presença de complexos com metais (Fe e Cu), sofrem uma decomposição, originando aldeídos (malondialdeídos), hidroperóxidos voláteis (pentano, etano) e outros produtos passíveis de serem identificados experimentalmente. Na terceira etapa, de terminação, dois radicais peroxil podem reagir entre si formando uma tetróxido instável, que se decompõe, originando oxigênio *singlet* e carbonilas excitadas. Estas espécies excitadas retornam ao estado fundamental, emitindo quantas de luz visível. Este processo é conhecido como quimiluminescência e se constitui num importante método de quantificação da LPO (11, 21, 43, 44).

Estes radicais seriam naturalmente neutralizados por um sistema endógeno de defesa antioxidante, enzimático e não-enzimático, que serviria para prevenir ou reparar a lesão oxidativa. A ação dos mesmos varia de acordo com a etapa do fenômeno oxidante. Ou seja, se a neutralização ocorrer na fase de iniciação ou propagação da LPO, havendo a formação de produtos menos tóxicos, a substância é chamada *scavenger*. A substância pode, também, absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os. Neste caso, é chamado de *quencher*. Dentre os antioxidantes preventivos (*scavengers*) estão a glutathiona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a vitamina E. Dentre os reparadores (*quenchers*) estão a glutathiona-reductase (GSH-Rd), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e o ácido ascórbico (38). Dentre os sistemas enzimáticos, podemos destacar três: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (Gpx). A SOD é o principal sistema de defesa em células aeróbicas, combatendo os efeitos tóxicos do oxigênio. Está amplamente distribuída, na forma que contém cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZn-SOD), presente no citosol das células eucarióticas ou na forma contendo manganês (Mn-SOD), localizada na matriz mitocondrial. Este complexo enzimático catalisa a dismutação do radical superóxido para

formar peróxido e oxigênio. Outra enzima extremamente importante é a catalase, hemoproteína peroxidase, específica para o H_2O_2 . Encontra-se amplamente distribuída em órgãos como o fígado, os rins, o cérebro e nos eritrócitos. Uma terceira enzima com importante ação neste contexto é a glutathiona peroxidase, possuindo uma ação peroxidase inespecífica para o H_2O_2 , podendo ou não utilizar selênio como cofator. Apresenta uma atividade significativa no fígado e nos eritrócitos, moderada no coração, nos rins e nos pulmões e baixa nos músculos. Esta enzima é requerida para a reação de hidroperóxidos (ROOH) com a glutathiona reduzida (GSH), originando glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Em condições fisiológicas normais, a exposição de animais às concentrações aumentadas de O_2 , frequentemente, ocasiona uma elevação da atividade da SOD, CAT e GPx em muitos tecidos, o que significa que a quantidade presente destes agentes anti-oxidativos, normalmente, é suficiente somente para equilibrar taxas normais de produção das EAO e, assim, preservar a integridade celular e, por conseguinte, dos órgãos (3, 10, 11, 40, 44).

Além do sistema antioxidante enzimático, também são considerados antioxidantes todas as substâncias que doam ou recebem um elétron de um radical livre, inativando-o. São exemplos o ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno, ácido úrico, alfa-tocoferol (vitamina E), albumina, transferrina e manitol. Há ainda aqueles que indiretamente têm um efeito antioxidante, como o alopurinol (inibidor da xantina oxidase), o selênio (presente na glutathiona peroxidase), a deferoxamina (quelante do ferro), entre outros (11, 44).

Com base na experiência científica acumulada ao longo do tempo, evidenciando o papel dos radicais livres de oxigênio na patogênese das lesões decorrentes da isquemia e reperfusão, vários trabalhos surgiram com o intuito de atenuar as repercussões hemodinâmicas e fisiopatológicas da restauração vascular pós-isquemia em vários tecidos e órgãos (7, 9, 20, 43, 45).

Embora a maior parte das estratégias tenha sido isoladamente bem-sucedida no laboratório experimental, na prática clínica, em função de uma série de variáveis, ainda não se chegou a um consenso. É possível que uma abordagem multifatorial, com o uso de combinações de agentes antioxidantes, seja a estratégia mais adequada para a maior parte das situações.

3.1.2 O papel do óxido nítrico na isquemia-reperfusão

As células endoteliais possuem a capacidade de sintetizar diversas substâncias envolvidas na modulação do tônus vascular e que causam relaxamento muscular e vasodilatação entre as quais podem ser destacadas a prostaglandina (PG12), a adenosina e o óxido nítrico (NO).

Após a isquemia e a reperfusão, a influência do endotélio pode ser perdida através da *down-regulation* ou inativação das prostaglandinas, adenosinas e a liberação do NO pode estar comprometida, aspectos que permitem uma vasoconstrição sem oposição. Além disso, a hipóxia que se segue a re-oxigenação resulta em uma liberação excessiva de endotelina-1, o vasoconstritor mais potente já identificado. Endotelina-1 (ET-1) é produzido, principalmente, por células endoteliais, mas também por células musculares lisas e células epiteliais dos túbulos renais. O dano endotelial decorrente poderia prejudicar ou impedir uma liberação adequada do fator de relaxamento endotelial derivado (EDRF), que foi identificado como sendo o NO, um mensageiro intra e intercelular difusível que passa através da maioria das células e tecidos com baixo consumo energético. A síntese do NO por meio da via metabólica L-arginina/NO pode ser induzida nas células inflamatórias por várias citocinas envolvidas na resposta induzida pela isquemia transitória, incluindo as interleucinas (IL-1 e IL-2), fatores de necrose tumoral e outros mediadores inflamatórios (16, 33).

Classicamente, se acredita que NO é sintetizado a partir de L-arginina, NADPH, tetrahydrobiopterina e oxigênio molecular catalisado por NOS. Recentemente foi descrita uma maneira diferente do NO ser produzido sob condições isquêmicas, independente da NOS, e o nitrito seria o responsável pela produção do NO no rim isquêmico (46).

O papel do óxido nítrico (NO) na injúria da I-R permanece controverso (47). Durante a I-R, foram reportados tanto efeitos benéficos quanto deletérios do óxido nítrico (19, 34). No sistema vascular, o NO liberado pelo endotélio vascular é responsável por uma ação regulatória da tonicidade dos vasos sanguíneos (aumentando as concentrações intracelulares de GMPc), inibe a agregação plaquetária secundária ao aumento intracelular de GMPc e, assim, impedindo a trombose vascular durante o período reperfusional. Bloqueia a aderência e migração monocitária, inibe a ativação leucocitária que leva a adesão neutrofílica-endotelial e a geração de EAO, age diretamente contra a expressão de

moléculas de adesão celular e tem uma ação vasodilatadora que interfere na microcirculação após a reperfusão, regulando o fluxo sanguíneo aos tecidos (fator relaxante endotélio derivado). Além disso, age também como controlador da liberação de produtos citotóxicos com ação vasoconstritora (leucotrienos, citoquinas e prostaglandinas) e possui um efeito citoprotetor direto nas células endoteliais durante a reação inflamatória (48). De outra forma, especificamente, no que se refere ao estresse oxidativo, o NO por apresentar um elétron desemparelhado na camada mais externa, possui a capacidade de interagir com outra molécula, podendo funcionar como acceptor de elétrons de espécies radicais e, portanto, exercer uma ação de *scavenger* do ânion superóxido, atuando, desse modo, como uma barreira extracelular contra ação citotóxica das espécies radicais de oxigênio (EAO). Todas estas ações interferem de alguma forma, benéficamente, no fenômeno isquêmico-reperfusional (18).

Na realidade, o NO, é uma espécie radical, porém não é altamente reativa quando considerado isoladamente. Entretanto, pode reagir rapidamente com um seletivo grupo de outros radicais e com metais de transição como o ferro de hemoglobina. Estes aspectos podem ser observados, por exemplo, quando da interação do NO com o radical superóxido, que pode levar a produção de peroxinitrito, um poderoso oxidante com uma reatividade similar ao do radical hidroxil. Embora não seja uma forma radical, o peroxinitrito poderia exercer efeitos oxidativos diretos sobre uma variedade de biomoléculas como sulfatos, tióis, lipídios, ascorbato, proteínas, carbo-hidratos e ácidos nucleicos, causando em última análise lipoperoxidação e nitrosilação (17, 19, 34).

3.1.3 Papel da mitocôndria na isquemia-reperfusão

Mitocôndrias são organelas com dois compartimentos, a matriz confinada pela membrana interna e o espaço intermembrana circundado pela membrana externa. Mitocôndria gera energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) através de fosforilação oxidativa, a qual transporta elétrons para a membrana interna, formando a cadeia de transporte de elétrons. O hidrogênio derivado da oxidação dos ácidos orgânicos é oxidado com O₂, para gerar água. O fluxo de elétrons gera energia para expelir prótons (H⁺). Como a membrana interna é praticamente impermeável, um gradiente eletroquímico se forma e é usado para reintroduzir prótons através da ATP sintetase. O fluxo de prótons

determina a condensação de ADP e fosfato inorgânico para formar ATP. Este é trocado com o ADP citosólico pelo translocador de adenina nucleotídeo (ANT). Assim, a manutenção deste gradiente eletroquímico é importante para o consumo de O₂ pela cadeia de transporte de elétrons que está acoplada com a fosforilação do ADP, pela ATP sintetase (14).

Normalmente, a mitocôndria produz uma pequena, mas fixa quantidade de espécies ativas de oxigênio (EAO), como produtos da respiração. A maioria do O₂ consumido pela mitocôndria é tetravalentemente reduzido pela água (por quatro elétrons). Uma proporção menor de O₂ é univalentemente reduzida (por um único elétron) que escapa pela cadeia de transporte de elétrons para formar superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). Este é convertido pela superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD) em hidrogênio peróxido (H₂O₂), que, por seu turno, é reduzido a água pela peroxidase, usando glutatona (GSH) como substrato. Glutaciona oxidada (GSSG) é reduzida com conversão do dinucleotídeo nicotinamida adenina reduzida (NADPH) em NADP. A mitocôndria também contém uma níttrico sintetase e pode produzir uma significativa quantidade de óxido nítrico para regular sua respiração. A produção fixa de pequenas quantidades de EAO é essencial para manter o estado “redox” para o funcionamento de numerosas enzimas (12, 14, 49, 50).

A isquemia diminui a eficácia do sistema antioxidante. Episódios curtos de isquemia podem não alterar o sistema antioxidante da mitocôndria. Um período isquêmico mais prolongado pode causar uma diminuição da atividade da cadeia de transporte de elétrons e resultar em diminuição da produção de ATP. Esta parada na cadeia de transporte leva a um escape de elétrons e a redução de O₂ por elétrons *single* com a formação de radicais superóxido. Além disso, a isquemia diminui a atividade das enzimas antioxidantes, como a MnSOD e depleta substratos, tais como a glutatona, o que torna as células mais suscetíveis ao estresse oxidativo na reperfusão (14).

A ausência do O₂ resulta em estímulo ao metabolismo anaeróbico com a quebra do ATP em ADP e AMP e o acúmulo de fosfato inorgânico que leva a uma permeabilização da membrana. Isto produz um aumento do cálcio na matriz mitocondrial. O metabolismo anaeróbico, também resulta em acúmulo de ácido láctico com conseqüente diminuição do pH mitocondrial, mas isto parece ser uma tentativa de proteger a célula da morte celular (14).

Dependendo da sua severidade, a reperfusão é caracterizada pelo aumento da formação de EAO, diminuição da produção de ATP e morte celular. A superprodução de superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), com a reintrodução do O_2 e a reduzida atividade da MnSOD leva a uma reação com o óxido nítrico para formar peroxinitrito, uma molécula altamente reativa, que leva a nitrosilação das proteínas, oxidação dos tióis e decomposição em radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), o qual pode ser formado através da reação de Fenton, a partir da insuficiente conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água, como resultado da depleção de GSH mitocondrial durante a isquemia (14).

As EAO produzidas na reperfusão podem também danificar proteínas, lipídios e DNA, o que leva a um impedimento da função mitocondrial e a morte celular. O dano às proteínas leva a redução dos níveis de ATP. O dano aos lipídios afeta a permeabilidade das membranas e, posteriormente, impede a produção de ATP. A permeabilidade da membrana interna também é afetada pelo estresse oxidativo que altera o estado *redox* pela oxidação das piridinas e tióis. A depleção dos tióis como a glutatona pode estar associada à degradação do DNA. Durante a reoxigenação, pode ocorrer morte celular devido ao aumento do pH mitocondrial ou por cálcio liberado da mitocôndria para o citosol, levando a ativação de proteases, nucleases e fosfolipases que disparam apoptose (14, 51).

3.2 Inibidores da fosfodiesterase tipo 5

A fosfodiesterase 5 (PDE-5) é uma enzima encontrada em diversas partes do corpo humano, como cérebro, coração, pulmão, rim, bexiga, próstata, uretra, pênis, útero e músculo esquelético. Ela atua na célula inativando o GMPc, diminuindo sua concentração intracelular. O GMPc é um importante segundo mensageiro intracelular do óxido nítrico (NO). O NO, produzido pela óxido nítrico sintase (NOS) a partir de L-arginina e oxigênio molecular, é gerado pelas células endoteliais, atravessa a membrana celular e se liga a guanil ciclase solúvel no citoplasma. Essa ligação aumenta a formação de GMPc, reduzindo os níveis celulares de cálcio, elemento fundamental na contração muscular lisa. Logo, inibidores específicos da PDE-5 são responsáveis pelo aumento intracelular de GMPc (22, 52, 53).

Drogas que inibem a PDE-5, como o sildenafil e a tadalafila, ou vardenafila são amplamente usadas na disfunção erétil. Além disso, estudos têm sugerido um potencial

efeito benéfico da sildenafil na proteção de órgãos submetidos à isquemia e à reperfusão em humanos (23), coelhos (24) e em ratos (25). Apesar de grande parte dos estudos nessa área envolverem cardiomiócitos, múltiplas linhas de evidência sugerem que o estímulo que leva a abertura dos canais de potássio sensíveis ao ATP pode induzir um potente efeito protetor em todos os tipos de células (54, 55, 56), inclusive as células renais (26, 27).

Como citado anteriormente, durante a isquemia-reperfusão renal as EAO são produzidas e elas podem comprometer a integridade do endotélio, prejudicando a formação de NO pelo mesmo, e resultando em um aumento da resistência vascular (57). O efeito em cascata a partir do aumento da concentração intracelular do GMPc produzido pelos inibidores da PDE-5 leva a vasodilatação sistêmica, o que sugere um possível efeito benéfico do uso da tadalafila, sildenafil ou da vardenafila na proteção do rim submetido ao fenômeno isquêmico-reperfusional (58).

Vários autores, recentemente, têm dirigido suas atenções para a sildenafil e seus efeitos na isquemia e reperfusão, sugerindo vários mecanismos de ação, que não a via do GMPc (59, 60, 61). Recentes estudos (62,63,64) relatam que o aumento do GMPc, promovido por um inibidor da PDE-5, é capaz de inibir a liperoxidação por bloquear a atividade e a expressão da NADPH oxidase, o que, conseqüentemente, reduz os níveis de RLO, especialmente O_2^- .

Tadalafila foi o terceiro inibidor da PDE-5 a aparecer no mercado, foi aprovado pela FDA no final de 2003. Sua estrutura química difere daquelas da sildenafil e da vardenafila e tem a meia vida mais longa que os outros dois, de 17,5 horas (65, 66).

Existem poucos estudos clínicos e experimentais observando a tadalafila e seus efeitos na isquemia-reperfusão. Em sua maioria, são estudos dirigidos aos efeitos da tadalafila em cardiomiócitos, todos demonstrando um efeito cardioprotetor (61, 67, 68, 69). Não há estudos disponíveis na literatura mundial relacionando a tadalafila ao fenômeno isquêmico-reperfusional renal.

4 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da inibição da fosfodiesterase tipo 5 no fenômeno isquêmico-perfusional renal em modelo experimental com suínos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bird JE, Milhoan K, Wilson C B et. al.. *Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction*. J Clin Invest, 81: 1630-1638, 1988.
2. Rodriguez-Penã A, Garcia Criado F J, Eleno N, Arevalo M, Lopez-Novoa J M. *Intrarenal Administration of Molsidomine, a Molecule Releasing Nitric Oxide, Reduces Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats*. American Journal of Transplantation; 4: 1605–1613, 2004.
3. Li C, Jackson R M. *Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury*. Am J Physiol Cell Physiol 282: C227-C241, 2002.
4. Orvieto M A, Tolhurst S R, Chuang M S, Lyon M B, Ritch C R, Rapp D E, Shalhav A L. *Defining maximal renal tolerance to warm ischemia in porcine laparoscopic and open surgery model*. Urology; 66(5):1111-5, 2005.
5. Thompson R H, Lane B R, Lohse C M, Leibovich B C, Fergany A, Frank I, Gill I S, Blute M L, Campbell S C. *Every minute counts when the renal hilum is clamped during partial nephrectomy*. Eur Urol; 58(3):340-5, 2010.
6. Baldwin D D, Maynes L J, Berger K A, Desai P J, Zuppan C W, Zimmerman G J, Winkielman A M, Sterling T H, Tsai C K, Ruckle H C. *Laparoscopic warm renal ischemia in the solitary porcine kidney model*. Urology, 64(3):592-7, 2004.
7. Giovanardi R O, Rhoden E L, Cerski C T, Salvador M, Kalil A N. *Pharmacological preconditioning using intraportal infusion of L-arginine protects against hepatic ischemia reperfusion injury*. J Surg Res, 155(2):244-53, 2009.
8. Grinyo J M. *Role of ischemia-reperfusion injury in the development of chronic renal allograft damage*. Transplant Proc, 33:3741–3742, 2001.
9. Toledo-Pereyra L H, Lopez-Neblina F, Toledo A H. *Reactive oxygen species and molecular biology of Ischemia/reperfusion*. Ann Transplant, 9(1):81-83, 2004.

10. Campos E B P, Yoshida W B. *O papel dos radicais livres na fisiopatologia da isquemia e reperfusão em retalhos cutâneos: modelos experimentais e estratégias de tratamento.* J Vasc Br;3(4):357-66, 2004.
11. Halliwell B. *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life.* Plant Physiology, 141:312-322, 2006.
12. Erusalimsky J D, Moncada S. *Nitric Oxide and Mitochondrial Signaling: From Physiology to Pathophysiology.* Arterioscler Thromb Vasc Bio, 27:2524-2531, 2007.
13. Duchen M R. *Roles of Mitochondria in Health and Disease.* Diabetes 53(1):96-102, 2004.
14. Jassem W and Heaton N D. *The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation.* Kidney Int., 66:514-517, 2004.
15. Valdivielso J M, Crespo C, Alonso J R et al *Renal ischemia in the rat stimulates glomerular nitric oxide synthesis.* Am J Physiol Regulatory Integrative Comparative Physiol; 280: 771-779, 2001.
16. Mumtaz F H, Khan M A, Thompson C S, Morgan R J, Mikhalidis D P. *Nitric oxide in the lower urinary tract: physiological and pathological implication.* Br. J. Urol. Intern., 85:567-78, 2000.
17. Nakajima A, Ueda K, Takaoka M, Yoshimi Y, Matsumura Y. *Opposite Effects of Pre- and Postischemic Treatments with Nitric Oxide Donor on Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury.* J Pharmacol Exp Ther., 316(3):1038-46, 2006.
18. Tripatara P, Pateli N S, Webb A, Rathod K, Leconte F M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Yaqoob M M, Ahluwalia A, Thiernemann C. *Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: role for xanthine oxidoreductase.* J Am Soc Nephrol, 18(2):570-80. 2007.
19. Guan Z, Gobé G, Willgoss D and Endre Z H. *Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide.* Am J Physiol Renal Physiol, 291:619-628, 2006.
20. Rhoden E L, Rhoden C R, Lucas M L, Pereira-Lima L, Zettler C, Bello-Kein A. *The role of nitric oxide pathway in the renal ischemia-reperfusion injury in rats.* Transplant Immunology, 10:277-284, 2002.
21. Ikatsu H, Nakajima T, Murayama N and Korenaga T. *Flow-Injection Analysis for Malondialdehyde in Plasma with the Thiobarbituric Acid Reaction.* Clin Chem, 38(10):2061-2065, 1992.
22. Kulkarni S K, Patil C S. *Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutical aspects.* Methods Find Exp Clin Pharmacol, 26(10):789-99, 2004.

23. Gori T, Sicuro S, Saverio D, Donati G, Forconi S, Parker J D. *Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels*. *Circulation*, 111:742-746, 2005.
24. Bremer Y A, Salloum F, Ockaili R, Chou E, Moskowitz W B, Kurkeja R C. *Sildenafil citrate (Viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits*. *Pediatr res*, 57(1):22-27, 2005.
25. Du Toit E F, Rossouw E, Salie R, Opie L H, Lochner A. *Effect of sildenafil on reperfusion function, infarct size, and cyclic nucleotide levels in the isolated rat heart model*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 19(1):23-31, 2005.
26. Choi D E, Jeong J Y, Lim B J, Chung S, Chang Y K, Lee S J, Na K R, Kim S Y, Shin Y T and Lee K W. *Pretreatment of sildenafil attenuates ischemia-reperfusion renal injury in rats*. *Am J Physiol Renal Physiol* 297:362–370, 2009.
27. Lledó-Garcia E, Subirá-Rios D, Rodríguez-Martínez D, Dulín E, Alvarez-Fernandez E, Hernandez-Fernandez C and Cânizo-López J F. *Sildenafil as a Protecting Drug for Warm Ischemic Kidney Transplants: Experimental Results* *The J of Urol*, 182:1222-1225, 2009.
28. Lehninger A. *Princípios de Bioquímica*. In.: *Sarvier* (ed.): São Paulo; 16-339, 2002.
29. Guyton A. *A célula e seu funcionamento*. In.: *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier (ed): Rio de Janeiro, 11-26, 45-56, 2006.
30. Padanilam B J. *Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284: 608-627, 2003.
31. Guo Z H, Mattson M P. *Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function*. *Cereb Cortex*. 10(1):50-7, 2000.
32. Walsh K B, Toledo A H, Rivera-Chavez F A, López-Neblina F, Toledo-Pereyra H. *Inflammatory Mediators of Liver Ischemia-Reperfusion Injury* *Exp Clin Transplant*. 7(2):78-93, 2009.
33. Langrehr J M, Machens C, Koch S, Zill E, Leder K, Neuhaus P. *Hematologic parameters are improved by inhibition of NO synthesis during graft-versus-host disease after small bowel transplantation*. *Transplant Proc*, 32(6):1288-9, 2000.
34. Goligorsky M S, Brodsky S V, Noiri E. *Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS* *Kidney International*, 61:855–861, 2002.
35. Wu M J, Lai L W, Lien Y H. *Cytoprotective effects of calbindin-D(28k) against antimycin-A induced hypoxic injury in proximal tubular cells*. *Life Sci*. 71(5):559-69, 2002.
36. Legrand M, Mik E G, Johanes T, Payen D e Ince C. *Renal Hypoxia and Dysoxia After Reperfusion of the Ischemic Kidney*. *Mol Med* 14(7-8):502-516, 2008.

37. Lien Y H H, Lai L W, Silva A L. *Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice*. Life Sci, 74:543–552, 2003.
38. Sutton T A. *Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury*. Microvasc Res, 77(1):4–7, 2009.
39. Rhoden E L, Pereira-Lima L, Lucas M, Mauri M, Rhoden C R, Pereira-Lima J C, Zettler C, Petteffi L, Belló-Klein A. *The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats*. Eur. Surg. Res., 32:215-222, 2000.
40. Schnackenberg C G. *Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature*. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol, 1 282:335–342, 2002.
41. Yamamoto T, Tada T, Brodsky S V, Tanaka H, Noiri E, Kajiya F and Goligorsky M S. *Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia*. Am J Physiol Renal Physiol, 282:1150-1155, 2002.
42. Thurman J M. *Triggers of Inflammation after Renal Ischemia/Reperfusion*. Clin Immunol, 123(1):7–13, 2007.
43. Rhoden E L, Lucas M L, Pereira-Lima L, Rhoden C R and Souto C A V. *Effects of L-arginine on the kidney levels of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion*. BJU International, 88:273-277 2001.
44. Gutteridge J M C. *Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage*. Clin Chem, 41(12):1819-1828, 1995.
45. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S and Goligorsky M S. *Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia*. Am J Physiol Renal Physiol, 281:948–957, 2001.
46. Okamoto M, Tsuchiyta K, Kanematsu Y, Izawa Y, Yoshizumi M, Kagawa S and Tamaki T. *Nitrite-derived nitric oxide formation following ischemia-reperfusion injury in kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 288:182–187, 2005.
47. Schulz R, Kalm M, Heusch G. *Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 61(3):402-13, 2004.
48. Cowley JR A W, Mori T, Mattson D and Zou A. *Role of renal NO production in the regulation of medullary blood flow*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 284:1355–1369, 2003.
49. Nistala R, Whaley-Connell A and Sowers J R. *Control of Renal Function and Hypertension*. Antiox Redox Signal, 10(12):2047-2089, 2008.
50. Kim J,; Kim K Y, Jang H, Yoshida T, Tsuchiya K, Nitta K, Park J W, Bonventre J V and Park K M. *Role of cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in ischemia-reperfusion injury in mouse kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 296:622–633, 2009.

51. Ravagnan I, Roumier T and Kroemer G. *Mitochondria, the Killer Organelles and Their Weapons*. J Cell Physiol, 192:131–137, 2002.
52. Carson C C and Lue T F. *Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction*. B J U Intern, 96:257–280, 2005.
53. Kanoo S, Deshpande S B. *Sildenafil increases the force of right atrial contractions in vitro via the NO-guanylyl cyclase pathway involving β -adrenoceptor linked mechanisms*. Pharmacol Rep, 61:1146-1152, 2009.
54. Das A, Xi L and Kukreja R C. *Phosphodiesterase-5 Inhibitor Sildenafil Preconditions Adult Cardiac Myocytes against Necrosis and Apoptosis*. J Biol Chem, 280(13):12944–12955, 2005.
55. Kukreja R. C. *Cardiovascular protection with sildenafil following chronic inhibition of nitric oxide synthase* Br J Pharmacol. 150: 538–540, 2007.
56. Xia Yy. *How does Viagra protect the ischemic heart?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 296:1209–1210, 2009.
57. Hanseen T N, D'alessandro A, Southard J H. *Long term cold ischemia reduces nitric oxide metabolism in reperfused rabbit kidneys*. Transplant Proc, 29:3417-3419, 1997.
58. Kloner R A. *Cardiovascular risk and sildenafil*. Am J Cardiol, 86: 57-61, 2000.
59. Elrod J W, Greer J J M and Lefer D J. *Sildenafil-mediated acute cardioprotection is independent of the NO/cGMP pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 292:342–347, 2007.
60. Das A, Salloum F N, Xi L, Rao Y J and Kukreja R C ERK. *Phosphorylation mediates sildenafil-induced myocardial protection against ischemia-reperfusion injury in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 296:1236–1243, 2009.
61. Salloum F N, Chau V Q, Hoke N N, Abbate A, Varma A, Ockaili R A, Toldo S, Kukreja R C. *Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Tadalafil, Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Through Protein-Kinase G-Dependent Generation of Hydrogen Sulfide*. Circulation, 120:31-36, 2009.
62. Perk H, Armagan A, Naziroglu M, Soyupek S, Hoskan MB, Sutcu R et al. *Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men*. J Clin Pharm Ther, 33:635-640, 2008.
63. Verit A, Savas M, Ciftci1 H, Aksoy N, Taskin A and Topal U. *Assessment of the acute effects of tadalafil on the cardiovascular system based on examination of serum oxidative status and paraoxonase activity in men with erectile dysfunction: a preliminary study*. Intern J Impot Res, 22:115–119, 2010.
64. Arikan DC, Bakan V, Kurutas EB, Sayar H, Coskun A. *Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary*. J Pediatr Surg, 45:2203–2209, 2010.

65. Coward R M, Carson C C. *Tadalafil in the treatment of erectile dysfunction*. Ther Clin Risk Manag, 4(6):1315–1329, 2008.
66. Kloner R A. *Cardiovascular Effects of the 3 Phosphodiesterase-5 Inhibitors Approved for the Treatment of Erectile Dysfunction*. Circulation. 110:3149-3155, 2004.
67. Ahmad N, Wang Y, Ali A K and Ashraf M. *Long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, induces sustained cardioprotection against lethal ischemic injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 297:387–391, 2009.
68. Rao Y J, Xi L. *Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts*. Acta Pharmacol Sin, 30 (1):1–24, 2009.
69. Patterson D, Kloner R, Effron M, Emmick J, Bedding A, Warner M, Mitchell M, Braat S and Macdonald T. *The effect of tadalafil on the time to exercise-induced myocardial ischaemia in subjects with coronary artery disease*. Br J Clin Pharmacol, 60(5):459–468, 2005.

6 ARTIGO REDIGIDO EM INGLÊS

EFFECTS OF TADALAFIL, A PHOSPHODIESTERASE-5 INHIBITOR, ON RENAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY: EXPERIMENTAL STUDY IN A PORCINE MODEL.

Post Graduation Course in Medical Science at Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Caudio Miguel Pinto Morales (1), Ernani Luis Rhoden (2), Grazielle Halmenschlager (3), Mauricio Veloso Brun(4), Rubens Rodriguez (5)

1 –Interinstitutional Master Degree Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Universidade de Passo Fundo - Passo Fundo, Brazil. e-mail: cm.morales@terra.com.br

2 – Post-Graduate Program in Medical Sciences at Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brazil. CNPq-Conselho Nacional de Pesquisa- Researcher Level 2. e-mail: ernanirhoden@yahoo.com.br

3 – Post-Graduate Program in Medical Sciences at Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

4 –Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidadende Passo Fundo (UPF)

5 – Faculty of Medicine, Universidade de Passo Fundo (UPF)

Correspondence to author:

Cláudio Miguel Pinto Morales, Vinte de Setembro St., 490/101, Centro, Passo Fundo- RS- Brazil- ZIPCODE 99025580. Phone-Fax: 55 54-33172220

e-mail: cm.morales@terra.com.br.

Abstract

Objective: To evaluate the potentially beneficial effects of tadalafil, a phosphodiesterase type 5 in an experimental model of renal ischemia and reperfusion in swines.

Material and Methods: Twelve Large White swines, uni-nephrectomized were divided into two groups of 6 animals each. Group 1 (n=6): In this group, the animals underwent renal normothermic ischemia for 50 minutes; Group 2 (n=6): animals subjected to renal normothermic ischemia for 50 minutes, but pre-treated with tadalafil. Results of renal function, histology and lipid peroxidation (malondialdehyde-MDA) in kidney tissues were analyzed. For statistical analysis we considered a $P < 0.05$.

Results: Renal function measures varied similarly in both groups ($P=0.3493$). Regarding histological parameters, the vacuolization scores ($P=0.016$) and interstitial infiltration of polymorphonuclears ($P=0.011$) were significantly higher in biopsy after 50min of ischemia in the group of animals not treated with tadalafil (G1) compared with the group of animals treated with the drug (G2) and, in addition, MDA values were significantly higher in the untreated group versus the group treated with tadalafil, respectively ($P=0.0023$).

Conclusion: The present study suggests for the first time in literature, that tadalafil has a protective effect on renal ischemia and reperfusion in swines, as evidenced by the histological and lipid peroxidation results.

Keywords: Tadalafil, renal ischemia and reperfusion, lipid peroxidation.

Introduction

The renal ischemia-reperfusion is a complex phenomenon involving several causes such as renal vasoconstriction, tubular damage and severe glomerular injury. In daily clinical and surgical practice these events are present in kidney transplantation, renal artery revascularization, treatment of aortic aneurysms, partial nephrectomy and nephrolithotomies (1).

Reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) have been implicated in the pathogenesis of tissue injury that occurs in renal ischemia-reperfusion (1,2).

These ROS may cause cellular injury through an oxidative phenomenon on the cellular membrane lipoprotein, especially the component polyunsaturated fatty acids. Moreover, the peroxidation of mitochondrial membranes, lysosomes and plasma can alter both the structure and function (3). The oxidative activity on the cell membrane lipoprotein produces a substance known as malondialdehyde (MDA). The intensity of oxidative activity has a close correlation with the amount of MDA produced and indirectly indicates the amount of ROS generated during ischemic-reperfusion phenomenon. (1,4,5).

The phosphodiesterase 5 (PDE-5) is an enzyme found in various organs such as brain, heart, lung, kidney, bladder, prostate, urethra, penis, uterus and skeletal muscle among others and its main activity is to degrade 3' 5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP), decreasing their intracellular concentration. (6). The cGMP is an important nitric oxide (NO) intracellular second messenger, which in turn is produced by nitric oxide synthase (NOS) from L-arginine and molecular oxygen, in terms of endothelial cells. (7). The PDE-5 inhibitors are responsible for increasing intracellular cGMP and their main mechanism of action involves the smooth muscle relaxation by decreasing intracellular concentrations of calcium. (6,8).

Drugs that inhibit PDE-5, such as sildenafil, tadalafil and vardenafil are widely used in erectile dysfunction. Furthermore, studies have suggested a potential beneficial effect of sildenafil in protection of organs subjected to ischemia and reperfusion in humans (9), rabbits (10) and in rats (11). Although most studies in this area involve cardiomyocytes, multiple lines of evidence suggest that the stimulus that leads to the opening of potassium channels sensitive to ATP (KATP channels) can induce a potent protective effect in all cell types (12). As previously mentioned, during the renal ischemia-reperfusion ROS are produced, and they may compromise the integrity of the endothelium, impairing the formation of NO and possibly result in an increase in vascular resistance (13). The cascade effect from the increase in intracellular concentration of cGMP produced by inhibiting PDE-5 leads to vasodilatation (14), suggesting a possible beneficial effect of the use of PDE5 inhibitors in protecting organ (s) in situations of transient ischemia (10,12). Besides that, recent studies report that the rise of cGMP is able to inhibit lipid peroxidation by blocking the reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) oxidase

activity and expression, which, consequently, reduces the, especially superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) (15,16,17).

Based on the above discussion the purpose of this study is to evaluate the effects of PDE5 inhibitor on renal protection in situations of ischemia and reperfusion of the organ.

Materials and methods

Animals

Twelve boars belonging to “Large White” breed, which weigh on average 30 kg with three months of age were used. The animals were kept for seven days under standard conditions, fed with Swine standard industrial balanced ration (COTAPEL, Tapejara, RS, Brazil) and water *ad libitum*. All the experimental procedures were performed according to NIH Guidelines for Use of Laboratory Animals and were approved by Ethical Committee for Research of the Universidade de Passo Fundo, under protocol number 179/2007 on 04/oct/2007. All the efforts were made to minimize discomfort, distress and pain in the animals.

Design

This is an experimental study. The animals were divided into two groups of six each. In the first, called Normothermic Ischemia Group (G1), the procedure was performed as described below. In the second group, called Tadalafil Ischemia Group (G2), tadalafil (Cialis[®], Eli Lilly do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) was administered at a dose of 20 mg for each animal eight hours before the procedure, in the second, fourth and sixth days of postoperative oral diet with the aforementioned.

Procedures

The procedures were carried out in the Surgery Unit of the Veterinary Hospital of the Medical Veterinary School of Universidade of Passo Fundo. Pigs were fasted 12 hours before surgery in order to avoid any adverse effects associated with anesthesia. After premedication with 0.5 mg/kg midazolam (Dormire®, Cristália, Itapira, SP, Brazil) and 0.5 mg/kg morphine (Dimorf®, Cristália, Itapira, SP, Brazil) both by intramuscular injection (IM). The animals were anesthetized with 0.5 mg/kg Diazepam (Diazepamil® União Química- Brasília, DF, Brazil) and 2 mg/kg 2,6-diisopropilphenol (Propofol®, Cristália-Itapira, SP, Brazil) both by intravenous access (IV). Controlled mechanical ventilation was provided and anesthesia was maintained with 20 ml/kg/min isoflurane (Isoforine®, Cristália-Itapira, SP, Brazil) under pure oxygen. Besides that, 20 µg/kg/h sufentanil (Fastfen®, Cristália- Itapira, SP, Brazil) was administered by continuous intravenous infusion. Ampicillin (Ampicilina®, Sandoz- Cambé, PR, Brazil) 22 mg/kg intravenously was administered as a prophylactic antibiotic before surgical operation and every 1.5h until the end of the surgery. As analgesic agent, we have used 2 mg/kg tramadol (Dorless®, União Química-Brasília, DF, Brazil) every 8 hour.

Immediately after anesthetized pigs were positioned in left lateral decubitus position and underwent right nephrectomy for the classical technique of laparoscopy with three trocars, as described below. The 10 cm portal was positioned in left para rectal line, 2 cm above umbilicus which allowed the cavity insufflation with carbon dioxide medical (CO₂, White Martins, Sapucaia do Sul, RS, Brazil) in a median flow of 3 liters per minute until a intra-abdominal pressure of 15 mmHg is reached and maintained until the end of the procedure. The zero degrees optics was introduced and the peritoneal cavity was inspected. After that, two additional portals, 10 mm (right) and 5 mm (left), were positioned laterally to the first, forming a triangle. Under direct vision, dissection of the hilum and isolation of renal vessels were proceed. Clips of polymer (Hem-o-lock®, WECK, Durham, North Carolina, USA) were used to ligature of the vessels individually. The remaining bands of vessels and the ureter were performed with titanium clips (Liga clip, VITALITEC, Plymouth, Massachussets, EUA). The kidney was dissected and removed from the renal cavity through the hole of the first trocar by using through a tissue extraction bag. The portal openings were closed with sutures in layers with nonabsorbable monofilament wire 2.0 (Prolene, ETHICON, São José dos Campos, São

Paulo) and the skin with monofilament 3.0 (Mononylon, ETHICON, São José dos Campos, São Paulo).

After this procedure the pigs were repositioned, now in the right lateral decubitus position and trocars were placed in the same arrangement as described above, to access the left kidney laparoscopically. The renal vessels were dissected, and individualized using the same technique and the same material described above. At this point (time zero), two fragments were removed from the cranial pole of the kidney with laparoscopic forceps, one stored in liquid nitrogen, and another in 10% formalin. After identification of the renal artery, it was clamped, by applying a laparoscopic bulldog vascular clamp (Bulldog Dieffenbach, Erwin Gut, Barueri, São Paulo, Brazil) for 50 minutes (period of normothermic ischemia). During this period, animals were maintained anesthetized and with intra-abdominal pressure previously described. After this time, and immediately before removal of the bulldog, a new biopsy was performed, with removal of two fragments, from the cranial pole of the kidney, and again stored as described above (time 50). The renal artery flow was released and kept under the same conditions of intra-abdominal pressure for 60 minutes. At the end of this time, two other fragments of the cranial pole of the kidneys were obtained and again stored as previously described technique (Time 110). After the last procedure has been completed, the anesthetic recovery was performed and the animals were kept under standard conditions of convalescence. On the seventh day after surgery the animals were anesthetized, according to the technique described above, and using the laparoscopic technique described above, a new kidney biopsies was obtained from the upper poles of each kidney and kept the way already described (seventh day time).

Blood samples were obtained daily to the seventh day, through puncture of the marginal ear vein. After obtaining the blood samples they were processed through a centrifuge and the serum was frozen for later laboratory tests for renal function determination.

Biochemical analysis of renal function

Renal function was evaluated by determining serum levels of creatinine and urea by the automation-kinetic method using specific kits (kit creatinine and urea kinetic, Cobas Miraplus, Roche®).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

The thawing of the kidney tissue, kept in liquid nitrogen, at an environmental temperature was performed, and later homogenized at a ratio of 9 ml of KCl 1.15% for each gram of tissue in a homogenizer (Ultra Turrax) for 1 min at environmental temperature of 0-2 degrees centigrade. The homogenates were, then, centrifuged in a refrigerated centrifuge (Sorvall RC 5B-rotor SM 24) for 10 minutes at 1000g. The precipitate was discarded and the supernatant was used for analysis. . It was used a thiobarbituric acid reactive substance technique (TBARS) (18) to determine the lipoperoxidation. Summarizing the homogenized acid precipitated with trichloroacetic acid at 10% and incubated with thiobarbituric acid (Sigma St. Louis, MO, USA) at 0,67% at a 100 degrees centigrade for fifteen minutes. It was next added butanol (1:1;v/v) to the tubes and again shaken for 40 seconds. They were again centrifuged for 10 minutes at 2500rpm. The supernatant was used for reading in the spectrophotometer (535 mm) (Lambda35 UV / Vis, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut,USA). The MDA curve was prepared with 1.1.3.3 tetra-methoxypropane (19).

The protein concentration was measured using the Bradford technique, at 595 nm in a spectrophotometer (Lambda 35 UV / Vis, Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA) using bovine serum albumin as standard (20).

Histological examinations

The fragments of biopsies were fixed in buffered formalin at 10% and after the usual procedures in pathological anatomy they were stained with hematoxylin-eosin (HE). The following characteristics, in these samples, were blindly analyzed: vacuolization of tubular cells, interstitial polymorphonuclear infiltration (PMN), glomerular polymorphonuclear infiltration (featuring glomerulitis), vascular congestion and acute tubular necrosis (ATN). Morphological changes such as eosinophilia, cell disruption, loss of architecture and nuclear changes with pyknosis and karyolysis were used to assess necrosis.

Analyses were performed on microscope Axiophot 2 (Zeiss, Munich, Germany) and the camera used was a model Pixelink PLA 662 (Pixelink, Ottawa, Canada).

The extension of the above changes, ie, vacuolization, PMN infiltration, glomerulitis, ATN and vascular congestion were quantified as described below: vacuolization (score 0-3): 0=absent, 1=focal, 2= multifocal, 3=diffuse; PMN infiltration (score 0-3): 0=absent, 1=focal, 2=multifocal, 3=diffuse; glomerulitis (score 0-3):0=absent, 1=focal (rare glomeruli), 2=multifocal (various glomeruli), 3=diffuse (most or all glomeruli); ANT (score 0-3):0=absent; 1=focal (rare tubules), 2=multifocal (various tubules), 3=diffuse (most or all tubules); congestion (score 0-2): 0=absent, 1=focal, 2=diffuse.

Statistical analysis

For the statistical analysis the software package SPSS 18 version® (SPSS In, Chicago, IL, USA) was used. Quantitative variables were described by mean and standard deviation and compared between groups by Student t test for independent samples. There was a comparison between the groups and within the groups by the analysis of variance for repeated measures (ANOVA) followed by Bonferroni test in multiple comparisons. The Mann-Withney U test was used to analyze categorical variables. With the purpose of statistical significance $P < 0,05$ was considered.

Results

Baseline levels of creatinine were similar in both groups of animals subjected to renal normothermic ischemia treated or not with tadalafil. Comparison between the two groups showed that the serum levels of creatinine varied in similar way ($P=0,3492$). In both groups there was a significant increase in the first two days and a return to baseline levels after 3 days and which remained until the seventh day. The data are shown in Table 1.

Serum urea showed no significant differences between the two groups of animals subjected to normothermic ischemia (Table 1).

In the lipid peroxidation variable it was observed that the tissue levels of MDA presented a significantly higher numerical values in the group of animals not treated with tadalafil (G1) when compared with that seen in animals treated with the substance (G2), this was more evident in the biopsy after 50 minutes of ischemia ($P=0,0023$). Data are expressed in Table 2.

The histology results showed no significant differences when the parameters of acute tubular necrosis, vascular congestion and glomerulitis were analyzed and compared in different moments. However, the vacuolization scores ($P=0,016$) as well as the interstitial polymorphonuclear infiltration (PMN) ($P=0,011$) were statistically higher in the biopsy made at 50 minutes of normothermic ischemia in the group of no treated animals with tadalafil (G1) when compared to the observed in the group of animals treated with tadalafil (G2). The data are expressed in Table 3 and shown in Figures 1 and 2.

Discussion

The need for temporary interruption of arterial blood flow to certain organs and tissues has been more widely observed in daily clinical practice. The need to understand the mechanisms involved in ischemic-reperfusion phenomenon, as well as the development of interventions that may reduce the deleterious effects of transient ischemia also occupy a central role in this context, certainly resulting in a significant impact in terms of therapeutic outcomes.

In the present study we observed that tadalafil administration before the induction of renal normothermic ischemia in uninephrectomized swines and maintained, every 48 hours for 7 days, significantly reduced the lipid peroxidation of renal cells as evidenced by lower tissue concentrations of malondialdehyde(MDA). Moreover, vacuolization and interstitial polymorphonuclear infiltrate were more severe in those animals not treated with tadalafil, although effects on renal function were not significantly different.

Despite considering that a great part of the studies involve cardiomyocytes, multiple lines of evidence suggest that inhibitors of type 5 fosfodiesterase may possibly induce a protective effect in several cell lines and tissues subjected to ischemic-reperfusion injury. Some authors (21,22) demonstrated that tadalafil protects against ischemia-reperfusion through the opening of potassium channels in mitochondrial membrane. Also, it was demonstrated that this drug decreases the size of the infarcted area after ischemia-reperfusion in rat cardiomyocytes (23). Other inhibitors of type 5 fosfodiesterase such as sildenafil and vardenafil also proven to be effective in protecting against ischemia and reperfusion in cardiomyocytes (24,25,26).

Ischemia and reperfusion of organs and tissues is a multifactorial phenomenon that involves a series of events and pathways reasonably well understood. In this context, some central aspects of this are related to the generation of ROS and its effects as well as the questions of the re-establishment of blood flow to the organ in the level of macro and microcirculation (5,27). In this respect, the phosphodiesterase inhibitors certainly have a potential beneficial effect. These substances act specifically in smooth muscle relaxation mediated by an interaction between nitric oxide and cGMP, reducing cellular levels of calcium which is a fundamental element in smooth muscle contraction. The possibility of involvement of inhibitors of phosphodiesterase type 5 with other mediators such as adenosine and bradykinin from endothelial cells has also been suggested, as well as the possibility of these substances exerting therapeutic effects at the level of vascular endothelium. (28,29)

Evidence in practical terms, can be seen in a state of art study by Lledó-Gracia and colleagues (12), where sildenafil was used in a model of renal transplant in swines. In the group treated with the referred substance, prior to the surgical procedure itself, and involving transient ischemia, was observed in the postoperative period a significant increase in arterial blood flow and decreased renal vascular resistance. Furthermore, serum

levels of nitric oxide metabolites were increased in animals treated with sildenafil, establishing a relationship of cause and effect in that study.

Unfortunately, studies involving tadalafil in such circumstances are not available so far in the literature, which eventually affects a comparative analysis with data from this study. However, based on observation in data of drugs with similar mechanisms of action, is likely that some derivation of results can be made respecting the methodological limits employees.

Perhaps the most relevant, from the standpoint of physiopathology, concerning normothermic ischemia is associate with acute renal failure, which in turn is characterized by a complex syndrome involving renal vasoconstriction, extensive tubular damage, tubular cell necrosis, glomerular damage and inadequate glomerular filtration(1).

The mechanisms proposed to explain the damage induced by transient ischemia include anoxia, release of ROS during reperfusion, neutrophil accumulation and subsequent release of additional ROS and lytic enzymes (30). ROS are strongly implicated in the pathogenesis of cell injury associated with renal ischemia-reperfusion (30).

The MDA is an end product of lipid peroxidation of lipid components of cell membranes and its concentration in tissues can directly reflect the extent of ischemic reperfusion injury (12,24,25,31). In the present study, the significant reduction of MDA concentrations is clearly demonstrated in animals that received tadalafil preoperatively and throughout the monitoring period. The preconditioning of the organ through a period of transient ischemia of short duration before a more prolonged period of ischemia has been shown to potentially beneficial especially because it involves the nitric oxide pathway (32). The possibility of involvement of such a phenomenon in this context with the use of inhibitors of type 5 fosfodiesterase should also be considered. Recent studies report that the increasing of cGMP promoted by an inhibitor of PDE-5 is capable of inhibiting lipid peroxidation by blocking the activity and expression of NADPH oxidase, which, therefore, reduces the levels of ROS, especially O_2^- (15,16,17). Furthermore, nitric oxide can act as a scavenger of superoxide and, on the other hand, produce substantial amounts of peroxynitrite with potential free radical effects (1,5,33).The lowest MDA, following the curve of his levels at different times, after the ischemic procedure, can possibly be explained by the phenomena described above.

However, despite the significant lower rate of tissue lipid peroxidation observed in those animals treated with tadalafil, the reflection of this in terms of renal function, here measured by serum creatinine and urea, was not different between groups. In terms of renal function, it is known that these tests have significant limitations for assessing more convincing function particularly related to glomerular filtration rate and clearance of endogenous creatinine. However the latter methods have significant limitations to be achieved in a context of experimental studies with animals of medium or large size.

Interestingly and, perhaps, one of the most interesting aspects of this study was that the vacuolization and interstitial PMN infiltration, pathological phenomena of significant relevance in this context, present rates significantly lower in the group treated with tadalafil at the biopsies performed after 50 min of ischemia when compared to untreated animals with this drug. In the model of renal ischemia published by Lledó-Garcia and colleagues (12), the preservation of endothelial structure was more evident in animals pretreated with sildenafil, without substantial changes in other measured parameters in a way that is consistent with the findings in the present study. The vacuolization, also called hidropic degeneration, is caused by failure of sodium and potassium pump due to ischemia and it would be a prior to acute tubular necrosis (34). The findings of this study in relation to interstitial PMN infiltration after ischemia initial corroborates studies showing that endogenous activation of neutrophils is an important factor in tissue damage in ischemic-reperfusion phenomenon (35,36). Histological findings and MDA tissue levels were remarkable higher in biopsy after 50 min of normothermic ischemia in renal tissues of the animals not treated with tadalafil, which strongly indicates the protective effect of this drug in transient renal normothermic ischemia.

The limitations of this study should be considered. Including the fact that an experimental study in swines, hinders an extrapolation of results to larger clinic context.

The sample size, oral administration of the drug tadalafil, which can cause its irregular absorption, the use of specific methods for evaluating the glomerular filtration rate and arterial blood flow or even to measure urine volume, certainly, of complex performing, when working in experimental studies with large animals should be considered limitation factors.

However, the minimally invasive procedure employed, and therefore less interference in postoperative recovery, the comparative approach among similar groups and

randomized as well as the possibility to observe animals for 7 days after surgery, significantly reduces potential biases making the results extremely interesting.

In conclusion, this study demonstrated that tadalafil presented a potential beneficial effect in renal ischemic-reperfusional phenomenon in swines, reducing the cellular lipid peroxidation and there is a trend for beneficial effects in terms of inflammatory infiltration and cell degradation associated with this condition.

References

1. Rhoden EL, Lucas ML, Pereira-Lima L et al. Effects of L-arginine on the kidney levels of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion. *BJU International*, 88: 273-277, 2001
2. Bird JE, Milhoan K, Wilson CB et al. Ischemic acute renal failure and antioxidant therapy in the rat: the relation between glomerular and tubular dysfunction. *J Clin Invest*, 81: 1630-1638, 1988.
3. Paller MS, Hoidal JR and Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic renal failure in the rat. *J Clin Invest*, 74: 1156-1164, 1984.
4. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology*, 141:312-322, 2006.
5. Schnackenberg CG. Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 282:335–342, 2002.
6. Carson CC and Lue TF. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *BJU International*, 96: 257-280, 2005.
7. Pollock JS and Carmines PK. NOS3 regulation: renal tubular epithelial cells are not simply large endothelial cells. *Hypertension*, 47: 19-21, 2006.
8. Kulkarni SK and Patil CS. Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutic aspects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 26(10): 789-99, 2004

9. Gori T; Sicuro S, Saverio D, Donati G, Forconi S, Parker JD. Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Circulation*, 111: 742-746, 2005.
10. Bremer YA, Salloum F, Ockaili R, Chou E, Moskowitz WB, Kukreja RC. Sildenafil citrate (Viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits. *Pediatr Res*, 57(1): 22-27, 2005.
11. Du Toit EF, Rossow E, Salie R, Opie LH, Lochner A. Effect of sildenafil on reperfusion function, infarct size, and cyclic nucleotide levels in the isolated rat heart model. *Cardiovasc Drugs Ther*, 19(1):23-31, 2005.
12. Lledó-Garcia E, Subirá-Rios D, Rodríguez-Martínez D et al. Sildenafil as a protecting drug for warm ischemic kidney transplants: Experimental results. *The Journal of Urology*, 182: 1222-1225, 2009.
13. Rodríguez-Peña A, García-Criado FJ et al. Intrarenal administration of Molsidomine, a molecule releasing nitric oxide, reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *American Journal of Transplantation*, 4: 1605-1613, 2004.
14. Kloner RA and Al-Ameri H. Erectile dysfunction and heart failure: the role of phosphodiesterase type 5 inhibitors. *International Journal of Impotence Research*, 21: 149-157, 2009.
15. Perk H, Armagan A, Naziroglu M, Soyupek S, Hoskan MB, Sutcu R et al. Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant effect in the blood of men. *J Clin Pharm Ther*, 33:635-640, 2008.
16. Verit A, Savas M, Ciftci H, Aksoy N, Taskin A and Topal U. Assessment of the acute effects of tadalafil on the cardiovascular system based on examination of serum oxidative status and paraoxonase activity in men with erectile dysfunction: a preliminary study. *Intern J Impot Res*, 22:115–119, 2010.
17. Arıkan DC, Bakan V, Kurutas EB, Sayar H, Coskun A. Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *J Pediatr Surg*, 45:2203–2209, 2010.
18. Buege JA and Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 52: 302-310, 1978.

19. Gonzales-Flecha et al. Hydroperoxide-initiate chemiluminescence: on assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Rad. Biol. Med.* 10:93-100, 1991.)
20. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Biochem*, 72:248-254, 1976.
21. Salloum FN, Chau VQ, Hoke NN, Abbate A, Varma A, Ockaili RA, Toldo S, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Tadalafil, Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Through Protein-KinaseG-Dependent Generation of Hydrogen Sulfide. *Circulation*, 120:S31-S36, 2009.
22. Ahmad N, Wang Y, Alia K and Ashraf M. Long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, induces sustained cardioprotection against lethal ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297:387–391, 2009.
23. Sesti C, Florio V, Johnson EG and Kloner RA. The phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil reduces myocardial infarct size. *Intern J Impot Res*, 19:55-61, 2007.
24. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J and Kukreja RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial KATP channels in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283:1263–1269, 2002.
25. Kukreja RC. Cardiovascular protection with sildenafil following chronic inhibition of nitric oxide synthase *Br J Pharmacol*, 150: 538–540, 2007.
26. Salloum FN, Takenoshita Y, Ockaili RA, Daoud VP, Chou E, Yoshida K, Kukreja RC. Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits. *J Mol Cell Cardiol*, 42(2):453-8, 2007.
27. Jassem W and Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int*, 66:514–517, 2004.
28. Kukreja RC, Salloum F, Das A et al., Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. *Vasc Pharmacol*, 42:219, 2005.
29. Schofield RS, Edwards DG, Schuler BT et al., Vascular effects of sildenafil in hypertensive cardiac transplant recipients. *Am J Hypertensive*, 16:874, 2003.

30. Toledo-Pereyra LH, López-Neblina F, Toledo AH. Reactive Oxygen Species and molecular biology of ischemia-reperfusion. *Annals of Transplantation*, 9(1):81-83, 2004.
31. Li JY, Yin HZ, Gu X, Zhou Y, Zhang WH, Qin YM. Melatonin protects liver from intestine ischemia reperfusion injury in rats. *World J Gastroenterol*, 28:14(48): 7392-7396, 2009.
32. Giovanardi RO, Rhoden EL, Cerski CT, Salvador M, Kalil AN. Pharmacological preconditioning using intraportal infusion of L-arginine protects against hepatic ischemia reperfusion injury. *J Surg Res*, 155(2):244-53, 2009.
33. Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S and Goligorsky MS. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281:948–957, 2001.
34. Tirapelli LF, Barione DF, Trazzi BF, Tirapelli DP, Novas PC, Silva CS, Martinez M, Costa RS, Tucci S Jr, Suaid HJ, Cologna AJ, Martins AC. Comparison of two models for evaluation histopathology of experimental renal ischemia. *Transplant Proc*, 41(10):4083-7, 2009.
35. Kinsey GR, Li L and Okusa MD. Inflammation in Acute Kidney Injury. *Nephron Exp Nephrol*. 109(4):102–107, 2008.
36. Xiong J, Xue FS, Yuan YJ, Wang Q, Liao X, Wang WL. Cholinergic anti-inflammatory pathway: a possible approach to protect against myocardial ischemia reperfusion injury. *Chin Med J*, 123(19):2720-6, 2010.

Tables

Table 1 – Variation of serum creatinine and urea levels in pigs uni-nephrectomizeds underwent renal normothermic ischemia for 50 minutes treated (G2) or not (G1) with tadalafil.

	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
Creatinine								
G1 (N=6)	1,1±0,2	1,8±0,3 *	1,5±0,3	1,5±0,5	1,4±0,3	1,5±0,2	1,5±0,4	1,4±0,4
G2 (N=6)	1,0±0,3	2,0±0,3 *	1,8±0,5	1,4±0,2	1,4±0,2	1,4±0,2	1,4±0,2	1,2±0,3
Urea								
G1 (N=6)	33±9	42±16	53±38	45±7	35±10	47±19	43±18	46±29
G2 (N=6)	24±10	48±17	44±30	30±9	31±10	30±11	33±9	31±9

Legends:T₀= Basal Value; T₁=1st day post surgery; T₂=2nd day post surgery; T₃=3th day post surgery; T₄=4th day post surgery; T₅=5th day post surgery; T₆=6th day post surgery; T₇=7th day post surgery. *p<0,05 relative to others measures

Table 2- Variation of renal tissue levels of malondialdehyde (MDA) in uni-nephrectomizeds pigs underwent renal normothermic ischemia for 50 minutes treated (G2) or not (G1) with tadalafil.

	M ₀	M ₁	M ₂	M ₃
G1 (N=6)	0,29±0,15	0,33±0,26	0,22±0,18	0,16±0,09
G2 (N=6)	0,21±0,20	0,07±0,07*	0,12±0,17	0,07±0,06*

Legends:G₁=Group not treated; G₂=Group treated; M₀=Biopsy zero min; M₁=Biopsy 50 min; M₂=Biopsy 110 min; M₃=Biopsy 7th day. *p=0,023 compared with the group G1.

Table 3 - Histology: Variation of median and standard deviation values of acute tubular necrosis (ATN), vacuolization, polymorphonuclear infiltration (PMN), vascular congestion and glomerulitis in uni-nephrectomized pigs underwent renal normothermic ischemia for 50 minutes treated (G2) or not (G1) with tadalafil.

	M₀	M₁	M₂	M₃
NTA				
G₁ (N=6)	0,14±0,38	1,0±0,0	2,3±0,76*	1,29±0,49*
G₂ (N=6)	0,29±0,49	1,0±0,58	1,57±0,98	0,71±0,49
Vacuolization				
G₁ (N=6)	1,43±0,53	1,86±0,38*	1,57±0,79	1,14±0,38
G₂ (N=6)	0,86±0,38	1,14±0,69	1,57±0,53	1,0±0,0
PMN				
G₁ (N=6)	1,43±0,53	1,71±0,49**	2,14±0,38	1,43±0,53
G₂ (N=6)	1,0±0,58	1,14±0,38	1,71±0,49	1,29±0,49
Glomerulitis				
G₁ (N=6)	1,43±0,53	1,71±0,49	2,0±0,0	1,43±0,53
G₂ (N=6)	1,0±0,0	1,29±0,49	1,57±0,79	1,14±0,38
Congestion				
G₁ (N=6)	0,86±0,38	1,14±0,38	1,14±0,38	1,57±0,53
G₂ (N=6)	0,57±0,53	1,14±0,69	0,86±0,69	1,0±0,58

Legends: M₀=Biopsy 0 min; M₁=Biopsy 50 min; M₂= Biopsy 110 min; M₃=Biopsy 7^o day; ANT=acute tubular necrosis; PMN=Polymorphonuclear infiltrate *P=0,016 when compared with group G₂; **P=0,011 when compared with group G₂

Figures

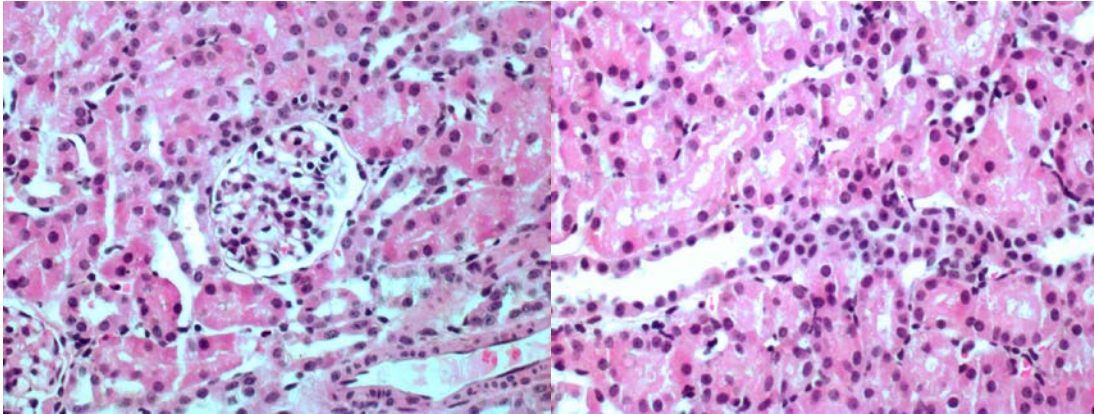


Figure 1-Histology of normal renal glomeruli (left) and normal renal tubules (right) of a swine of the group treated with tadalafil (G2), biopsy before the beginning of the normothermic ischemia (time 0 min) (HE 200x).

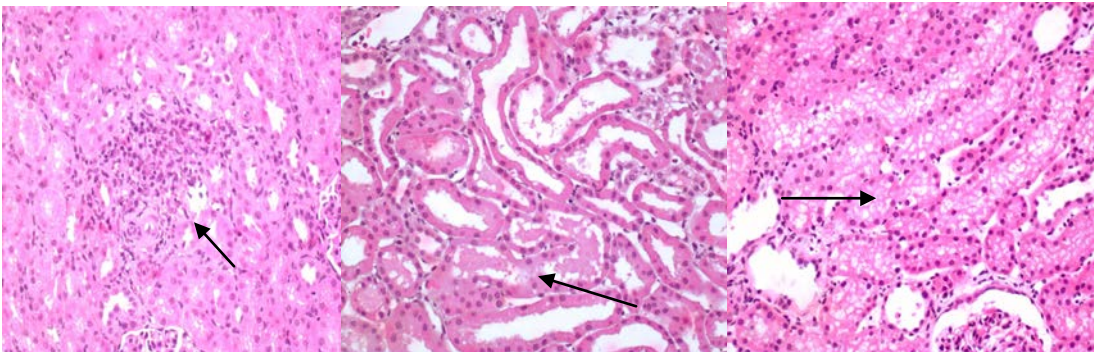


Figure 2-Histopathological results: interstitial polymorphonuclear infiltration in renal tissue of swine of the group not treated with tadalafil (G1), biopsy after 50 min of normothermic ischemia (time 50 min) (left); diffuse acute tubular necrosis in renal tissue of swine of the group not treated with tadalafil (G1), biopsy after 60 min of reperfusion (time 110 min) (middle); intense vacuolization in renal tissue of swine of the group not treated with tadalafil (G1), biopsy after 50 min of normothermic ischemia (time 50 min) (right) (HE 200x).