



FÁBIO HENRIQUE DA SILVA

**PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DISFUNÇÃO ERÉTIL EM
RATOS DE MEIA-IDADE: PREVENÇÃO POR TERAPIA
ANTIOXIDANTE**

**Campinas
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

FÁBIO HENRIQUE DA SILVA

**PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA DISFUNÇÃO ERÉTIL EM
RATOS DE MEIA-IDADE: PREVENÇÃO POR TERAPIA
ANTIOXIDANTE**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Edson Antunes

**Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de
Doutor em Farmacologia.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
FÁBIO HENRIQUE DA SILVA, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. EDSON ANTUNES.

Assinatura do Orientador

**Campinas
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38p Silva, Fábio Henrique da, 1987-
Papel do estresse oxidativo na disfunção erétil em ratos de meia-idade :
prevenção por terapia antioxidante / Fábio Henrique da Silva. – Campinas, SP :
[s.n.], 2014.

Orientador: Edson Antunes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Corpo cavernoso. 2. Óxido nítrico. 3. Envelhecimento. 4. NADPH oxidase. I.
Antunes, Edson, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Role of oxidative stress in erectile dysfunction in middle-aged rats :
prevention by antioxidant therapy

Palavras-chave em inglês:

Corpus cavernosum

Nitric oxide

Aging

NADPH oxidase

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Edson Antunes [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Fernando Silva Carneiro

Carlos Renato Tirapelli

Juliana Signori Baracat Zeferino

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FÁBIO HENRIQUE DA SILVA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). EDSON ANTUNES

2. PROF(A). DR(A). SISI MARCONDES PASCHOAL

3. PROF(A). DR(A). FERNANDO SILVA CARNEIRO

4. PROF(A).DR(A). CARLOS RENATO TIRAPELLI

5. PROF(A).DR(A). JULIANA SIGNORI BARACAT ZEFERINO

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 26 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A Deus, por estar presente em minha vida...

Me iluminando e amparando...

Aos meus pais, João e Cacilda,

Os maiores responsáveis pela minha formação e por onde estou.

Obrigado pelo carinho, apoio e por sempre acreditar em mim.

Meu amor e minha gratidão por vocês serão eternos...

A minha irmã, Lenise

Pela alegria, amizade, carinho e amor...

Pelo incentivo nesta caminhada.

A minha namorada, Nádia

Pela presença constante, por seu amor e dedicação em todos os momentos...

Minha incentivadora... Minha amiga...

Minha vida...

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Antunes, agradeço imensamente pela confiança e por sua orientação. Agradeço por ter me ensinado o caminho da pesquisa e por toda ajuda dada durante essa caminhada. Serei eternamente grato.

Agradeço em especial os meus amigos Mário A. Claudino, Haroldo F. Toque e Julio R. Moscoso por terem me recebido com tanto empenho.

Aos meus tios, Adalcio, Romilda e Edna por sempre me ajudarem.

A mãe da minha namorada, Vera, por ter me acolhido nesta cidade, longe de minha família, com tanto carinho e incentivo.

Aos amigos da cascata, Fabiano Beraldi Calmasini, Eduardo Costa Alexandre, André Arruda, Luiz Osório Silveira Leiria, Celso Saragossa Filho, Maria Andréia Delbin, Fernando Báu, Samuel Barillas, Fernanda Priviero, Fernanda Dell, Lorenzo Pincinatti, Paulo Gonzales, Rodrigo Capel, Renata, Rafael Campos, Camila, Fabíola, Tuany, Marcy, Carmem pela amizade e companhia diária, pelo respeito e ajuda indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de laboratório Lineu Baldissera, Marina Calixto, Carol, Diana, Dalize Squebola, Gláucia Mello, Maria Elisa, Sandro e Camila, agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.

Agradeço o professor Dr. Fernando Ferreira Costa, por ter dado a oportunidade de um pós-doutorado.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, Dra. Sisi Marcondes, Dr. Stephen Hyslop, Dr. Gabriel Forato Anhê, Dr. André Schenka e Dr. Heitor Moreno Junior, pela atenção dispensada durante o cumprimento dos créditos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Bruno, Gildo, Agnaldo, Antonio, Adílson e especialmente, agradeço ao Sr. Miguel Borges da Silva pelo competente trabalho que realiza no cuidado diário dos animais de experimentação.

Um singelo agradecimento e o meu respeito aos ratos, que, ainda que involuntariamente, deram suas vidas a esta pesquisa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado – 2011/11309-7 (08/2011-02/2014).

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS E SAIS.....	xxi
LISTA DE ABREVIACOES.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xxvii
LISTA DE FIGURAS.....	xxix
RESUMO.....	xxxiii
ABSTRACT.....	xxxvii
1. INTRODUÇÃO.....	43
1.1. Anatomia, inervação e hemodinâmica peniana.....	44
1.2. Contração do corpo cavernoso e flacidez peniana.....	50
1.3. Relaxamento de corpos cavernoso e ereção peniana: Importância do óxido nítrico (NO) na ereção peniana.....	51
1.4. Disfunção erétil, envelhecimento e estresse oxidativo.....	53
1.5. NADPH oxidase, apocinina e disfunção erétil.....	56
JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	58
OBJETIVOS.....	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
2.1. Animais.....	62
2.2. Preparo dos corpos cavernosos isolados de ratos.....	62
2.3. Curvas concentração-resposta.....	63
2.4. Estimulação elétrica.....	64
2.5. Monitoramento da pressão intracavernosa (experimentos “ <i>in vivo</i> ”)......	65

2.6. Determinação dos níveis de GMPc.....	66
2.7. Técnica de RT-PCR em tempo real.....	67
2.7.1. Extração de RNA.....	67
2.7.2. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	68
2.7.3. Desenho dos <i>primers</i>	69
2.7.4. Padronizações para o PCR quantitativo em tempo real.....	69
2.7.4.1. Concentração e eficiência do <i>primer</i>	69
2.7.5. PCR Quantitativo em tempo real – “real time RT-PCR”.....	70
2.7.6. Quantificação e normalização das amostras pelo método geNorm version 3.4	71
2.8. Western blotting.....	72
2.9. Dosagem de espécies reativas de oxigênio (ERO).....	73
2.10. Análise estatística.....	74
3. RESULTADOS	75
3.1. Relaxamento do corpo cavernoso em rato de meia-idade.....	76
3.1.1. Medidas de pressão intracavernosa.....	76
3.1.2. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pela acetilcolina.....	76
3.1.3. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo nitroprussiato de sódio.....	80
3.1.4. Relaxamento nitrérgico.....	82
3.1.5. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272.....	84
3.1.6. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo sildenafil.....	86
3.1.7. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo 8-Br-GMPc.....	88

3.1.8. Efeito do tratamento crônico com apocinina sobre o relaxamento induzido pela ACh, SNP e EFS em corpo cavernoso.....	89
3.1.9. Determinação dos níveis de GMPc em corpo cavernoso.....	87
3.1.10. Expressão protéica da nNOS, eNOS total, GCs (subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$) e da fosforilação da eNOS em corpos cavernosos.....	95
3.1.11. Expressão gênica da gp91 ^{phox} e SOD-1.....	98
3.1.12. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em corpo cavernoso.....	99
3.1.13. Expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs em corpos cavernosos.....	101
3.2. Contração do corpo cavernoso em rato de meia-idade.....	102
3.2.1. Contração de corpo cavernoso induzida por EFS.....	102
3.2.2. Contração de corpo cavernoso induzida pela fenilefrina.....	104
3.2.3. Efeito do tratamento crônico com apocinina sobre a contração induzida pela EFS e fenilefrina em corpo cavernoso.....	106
3.2.4. Expressão protéica da tirosina hidroxilase em corpos cavernosos.....	109
4. DISCUSSÃO.....	111
5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	123
6. RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE DROGAS E SAIS

LISTA DE DROGAS E SAIS

DROGAS

8-Bromo-GMPc
Acetilcolina
Apocinina
Atropina
BAY 41-2272
CaCl₂
Dihidroetidina
DMSO
Fenilefrina
Guanetidina
HCl
KCl
KH₂PO₄
MgSO₄
NaCl
NaHCO₃
N^ω-nitro-L-arginina metil éster
Nitroprussiato de sódio
ODQ
Prazosin
SOD
Sildenafil
Uretana

PROCEDÊNCIA

Sigma (St. Louis, EUA)
Sigma (St. Louis, EUA)
Sigma (St. Louis, EUA)
Sigma (St. Louis, EUA)
BAYER (Wuppertal, Alemanha)
Merck (Darmstadt, Alemanha)
Sigma (St. Louis, EUA)
Sigma (St. Louis, EUA)
Sigma (St. Louis, EUA)
Sigma (St. Louis, EUA)
Merck (Darmstadt, Alemanha)
Sigma (St. Louis, EUA)
Pfizer (New York, EUA)
Sigma (St. Louis, EUA)

LISTA DE ABREVIACES

LISTA DE ABREVIACOES

ACh: acetilcolina

Apo: apocinina

BAY 41-2272: 5-ciclopropil-2-[1-(2-fluor-benzil)-1H-pirazol[3,4-b]piridin-3-il]-pirimidin-4-ilamina.

Ca²⁺: íon cálcio

CC: corpo cavernoso

DHE: dihidroetidina

EFS: estimulação elétrica de campo

E_{max}: resposta máxíma

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

E.P.M.: erro padrão da média

ET-1: endotelina-1

GCs: guanilato ciclase solúvel

GDP: difosfato de guanosina

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GTP: trifosfato de guanosina

ICP: pressão intracavernosa

L-Arg: L-arginina

L-NAME: N^o-nitro-L-arginina metil éster

Min: minutos

mmHg: milímetros de mercúrio

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NANC: não-adrenérgico não-colinérgico

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

ODQ: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

PAM: pressão arterial média

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

PE: fenilefrina

pEC₅₀: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo

PI3K: fosfatidil-inositol 3-quinase

SNP: nitroprussiato de sódio

SOD: superóxido dismutase

TH: tirosina hidroxilase

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência e concentração dos fragmentos amplificados de cada par de <i>primer</i>	56
Tabela 2. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade.....	66
Tabela 3. Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, 4 semanas).....	76

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação da resposta erétil <i>in vivo</i>	64
Figura 2. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em corpos cavernosos.....	65
Figura 3. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos.....	68
Figura 4. Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas.....	70
Figura 5. Curvas concentração-efeito ao BAY 41-2272 em corpos cavernosos.....	72
Figura 6. Curvas concentração-efeito ao sildenafil em corpos cavernosos.....	74
Figura 7. Curvas concentração-efeito ao 8-Br-GMPc em corpos cavernosos.....	75
Figura 8. Curvas concentração-efeito à ACh e SNP em corpos cavernosos.....	77
Figura 9. Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas.....	78
Figura 10. Níveis de GMPc em homogenatos de corpos cavernosos.....	79
Figura 11. Expressão protéica da eNOS-total, p-eNOS (Ser-1177 e Thr-495) e nNOS.....	82
Figura 12. Expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs em corpo cavernoso.....	83
Figura 13. Expressão gênica do componente da NADPH oxidase (gp91 ^{phox}) e SOD-1.....	84
Figura 14. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em corpos cavernosos.....	86
Figura 15. Expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs.....	87
Figura 16. Contrações de corpos cavernosos induzidas por estimulações elétricas.....	89

Figura 17. Curvas concentração-efeito à fenilefrina em corpos cavernosos.....	91
Figura 18. Contrações neurogênicas de corpos cavernosos.....	93
Figura 19. Curvas concentração-efeito à fenilefrina.....	94
Figura 20. Expressão protéica da tirosina hidroxilase.....	95

RESUMO

A prevalência da disfunção erétil (DE) aumenta progressivamente com o envelhecimento, sendo 29% em homens de meia-idade (40-49 anos). O aumento do estresse oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas das complicações vasculares decorrentes do envelhecimento, podendo contribuir para a DE na meia-idade. Uma das principais consequências do aumento do estresse oxidativo é a inativação do óxido nítrico (NO) pelas altas concentrações de ânion superóxido (O_2^-). O NO pode reagir com o O_2^- , produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$), reduzindo assim a biodisponibilidade de NO e o relaxamento dos corpos cavernosos. Assim, propusemos a hipótese que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade (CCRM) contribui para a DE nesta faixa etária. Para tanto, utilizamos ratos jovens (3,5 meses) e de meia-idade (10 meses). Na primeira etapa, estudamos o papel do estresse oxidativo sobre os mecanismos relaxantes de CCRM. A pressão intracavernosa (*in vivo*) foi significativamente menor nos ratos de meia-idade. Os relaxamentos produzidos pela acetilcolina (ACh; 10 nM – 10 mM), nitroprussiato de sódio (SNP; 10 nM – 10 mM), sildenafil (1 nM – 10 μ M), BAY 41-2272 (1 nM – 10 μ M) e estimulação elétrica (EFS; 8 – 32 Hz) foram significativamente menores nos CCRM, sendo estes prevenidos pela pré-incubação com apocinina (100 μ M) ou superóxido dismutase (SOD; 75 U/ml). O tratamento crônico com apocinina (85 mg/rato/dia, por 4 semanas) também preveniu a redução dos relaxamentos induzidos pela ACh, SNP e EFS em CCRM, sem modificar as respostas nos ratos jovens. O relaxamento induzido pelo 8-Br-GMPc (10 nM – 300 μ M) permaneceu inalterado nos CCRM. Os níveis de GMPc basais e estimulados pelo SNP ou BAY 41-2272 foram significativamente menores nos CCRM em comparação com o grupo jovem, sendo restaurados pela apocinina ou SOD. A expressão protéica da nNOS, fosfo-eNOS (Ser-1177) e GCs (subunidades α_1 e β_1) foi significativamente menor nos CCRM, mas nenhuma mudança foi observada para a expressão protéica da eNOS total e fosfo-eNOS (Thr-495). A expressão do RNAm da gp91^{phox} foi maior nos CCRM. A expressão do RNAm da SOD-1 foi similar entre o grupo jovem e de meia-idade. Os níveis basais de ERO foram 64% maiores nos CCRM em comparação com o grupo jovem. Na segunda etapa do nosso estudo, estudamos o papel do estresse oxidativo sobre os mecanismos contráteis dos CCRM. As respostas contráteis induzidas pela EFS (4 – 32 Hz) foram significativamente maiores nos CCRM, as quais foram acompanhadas por um aumento de 2 vezes na expressão protéica da tirosina hidroxilase. As respostas contráteis induzidas pela fenilefrina também foram maiores nos CCRM. O tratamento crônico com apocinina (85 mg/rato/dia, por 4 semanas) restaurou o aumento da contração induzida pela fenilefrina e EFS, assim como a expressão protéica para tirosina hidroxilase e GCs (subunidade α_1 e β_1) nos CCRM. Em suma, nossos resultados mostram que a DE em ratos de meia-idade está associada à redução da biodisponibilidade do NO devido o aumento da expressão do RNAm da gp91^{phox} e redução da expressão protéica da nNOS e fosfo-eNOS (Ser-1177). A DE na meia-idade também está ligada a aumento da expressão da tirosina hidroxilase e da resposta contrátil. A redução da expressão da GCs (subunidades α_1 e β_1) também parece

participar da DE em ratos de meia-idade. O tratamento crônico com apocinina reverteu os efeitos deletérios das ERO em ratos meia-idade, melhorando assim a função erétil. Portanto, a diminuição do estresse oxidativo no tecido erétil por terapias antioxidantes pode ser uma boa estratégia farmacológica para o tratamento da DE em estágios iniciais de impotência sexual masculina.

ABSTRACT

The prevalence of erectile dysfunction increases progressively with age, being 29% in middle-aged men (40- to 49-year-old men). The increased oxidative stress has been implicated as a major cause of ED-associated vascular complications as and may contribute to ED in middle age. One major consequence of the increased oxidative stress is the inactivation of nitric oxide (NO) by high concentrations of superoxide anion (O_2^-). The NO can react with O_2^- , producing peroxynitrite ($ONOO^-$), thus reducing the NO bioavailability and the corpus cavernosum relaxation. Thus, we hypothesized that increases in reactive-oxygen species (ROS) production in corpus cavernosum of middle-aged rats (CCMR) contributes to ED in this age group. Therefore, we used young (3.5-month) and middle-aged (10-month) rats. We first studied the role of stress oxidative on the relaxant mechanisms of CCMR. The ICP was significantly reduced in middle-aged rats. The relaxations induced by acetylcholine (ACh; 10 nM – 10 mM), sodium nitroprusside (SNP; 10 nM – 10 mM), sildenafil (1 nM – 10 μ M), BAY 41-2272 (1 nM – 10 μ M) and electrical field-stimulation (EFS; 8 – 32 Hz) were significantly decreased in CCMR, all of which prevented by pre-incubation with apocynin (100 μ M) or superoxide dismutase (SOD; 75 U/ml). The treatment chronic with apocynin (85 mg/rat/day, 4 weeks) also prevented the reduction of relaxations induced by ACh, SNP and EFS in CCMR, without changing the response in the young rats. Relaxation induced by 8-Br-GMPc (10 nM – 300 μ M) remained unchanged. Basal levels of cGMP and stimulated with SNP or BAY 41-2272 were significantly lower in CCMR in comparison with young group, which were restored by apocynin or SOD. Protein expression of nNOS, phosphorylated eNOS (p-eNOS) (Ser-1177) and sGC (α 1 and β 1 subunits) was reduced in CCMR, but no changes were observed in the protein expression for total eNOS and p-eNOS (Thr-495). The mRNA expression for the gp91^{phox} was higher in CCMR. The mRNA expression for the SOD-1 was similar between young and middle-aged groups. Basal levels of ROS were 64% higher in the middle-aged in comparison with young group. In a second part, we studied the role of stress oxidative on the contractile mechanisms of CCMR. Contractile responses elicited by EFS (4-32 Hz) were significantly greater in CCMR, which were accompanied by a 2.0-fold higher protein expression of tyrosine hydroxylase. The contractile responses induced by phenylephrine were also greater in middle-aged group. The treatment chronic with apocynin (85 mg/rat/day, 4 weeks) restored the increase of contraction induced by phenylephrine and EFS, as well as the protein expression of tyrosine hydroxylase and sGC (α 1 and β 1 subunits) in CCMR. In conclusion, our data shows that ED seen in middle-aged rats is associated with decreased NO bioavailability due to upregulation of mRNA expression for gp91^{phox} and downregulation of nNOS e p-eNOS (Ser-1177). The ED in middle aged is also associated with increased protein expression of tyrosine hydroxylase and contractile responses. Downregulation of GCs (α 1 and β 1 subunits) in cavernosal also appears to participate to ED in middle-aged rats. The treatment chronic with apocynin reverted the deleterious effects of ROS in middle-aged rats, thus ameliorating the erectile function. Therefore, decrease of oxidative stress in erectile tissue

by antioxidant therapies may be a good pharmacological approach to treat ED at early stages of the male impotence.

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo complexo com múltiplas alterações na fisiologia do organismo (Hwang *et al.*, 2009). O crescimento da população idosa é um fenômeno mundial. As projeções mais conservadoras indicam que em 2020 o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos, com um contingente superior a 30 milhões de pessoas (de Carvalho e Garcia, 2003). A cada ano, 650 mil novos idosos são incorporados à população brasileira, sendo as doenças do sistema cardiovascular as mais prevalentes em idosos (Veras, 2009; Naughton *et al.*, 2006). A taxa de mortalidade por doenças cardíacas e acidente vascular cerebral aumenta exponencialmente com o envelhecimento, respondendo por mais de 40% em pessoas com idades entre 65-74 anos e aproximadamente 60% com idade igual ou superior a 85 anos (Ungvari *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o envelhecimento é um fator de risco para a disfunção erétil (DE), independentemente de comorbidades, como doenças cardiovasculares (Johannes *et al.*, 2000). A prevalência de DE aumenta progressivamente com o envelhecimento, acomete não somente idosos, mas também grande percentagem de homens de meia-idade (Feldman *et al.*, 1994; Teles *et al.*, 2008). Tem sido sugerido que o diagnóstico de DE em “indivíduos saudáveis” ajuda a indicar alterações precoces no sistema cardiovascular. Dessa forma, a DE pode ser considerada um marcador importante no diagnóstico de disfunção vascular (Thompson *et al.*, 2005; Böhm *et al.*, 2010). O estresse oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas implicadas em complicações vasculares decorrentes do envelhecimento (El Assar *et al.*, 2013). Entretanto, até o momento nenhum estudo avaliou o efeito do estresse oxidativo associado ao envelhecimento na função erétil em ratos de meia-idade. Assim, propusemos a hipótese

que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos corpos cavernosos em ratos de meia-idade contribui para a DE nesta faixa etária.

1.1. Anatomia, inervação e hemodinâmica peniana

A anatomia geral do pênis é semelhante em todas as espécies de mamíferos. O pênis humano consiste de três segmentos cilíndricos: os corpos cavernosos pareados localizados na parte dorsal e o corpo esponjoso na parte ventral, o qual circunda a uretra e forma a glânde peniana na porção distal. Cada um dos corpos cavernosos é circundado por um tecido fibroso e compacto, a túnica albugínea, a qual é constituída em grande parte de fibras de colágeno, bem como de algumas fibras de elastina (Sattar *et al.*, 2004). O tecido erétil dos corpos cavernosos é composto de múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais, além das trabéculas, que formam as paredes das lacunas e consistem de bandas espessas de músculo liso e de uma estrutura fibroelástica formada por fibroblastos, colágeno e elastina (Krane *et al.*, 1989). Os corpos cavernosos são divididos por um septo perfurado, incompleto no humano, que os permite funcionar como uma unidade.

A parte proximal do pênis encontra-se ancorada ao osso pélvico, sendo esta região denominada crura dos corpos cavernosos, enquanto a parte proximal do corpo esponjoso forma o bulbo peniano. Tanto a crura quanto o bulbo estão conectados aos músculos estriados. O bulbo peniano está circundado pelo músculo bulbocavernoso (ou bulboesponjoso), ao passo que a crura peniana está circundada pelo músculo isquiocavernoso. A glânde peniana apresenta uma aparência de esponja devido a um vasto

plexo venoso com um grande número de anastomoses (Yiee *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2012).

A inervação do pênis é autonômica (vias simpáticas e parassimpáticas) e somática (vias sensoriais e motoras). A partir do plexo pélvico, as inervações simpáticas e parassimpáticas confluem, formando o nervo cavernoso. O nervo cavernoso é um ramo do plexo pélvico que adentra os corpos cavernosos e esponjosos para efetuar os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescência. Os nervos somáticos são responsáveis pelas sensações e pela contração dos músculos bulbo cavernoso e isquiocavernoso (Dean & Lue, 2005).

A via simpática origina-se do 11º segmento torácico e do 2º lombar, passando através do ramo ventral do nervo espinhal (ramo comunicante branco) para a cadeia ganglionar simpática. Algumas fibras dirigem-se através dos nervos esplânicos para os plexos hipogástrico superior e mesentérico inferior, através do nervo hipogástrico, em direção ao plexo pélvico (De groat & Booth, 1993).

A via parassimpática surge de neurônios localizados do 2º ao 4º segmentos sacrais. As fibras pré-ganglionares passam pelo plexo hipogástrico superior pélvico para o plexo pélvico. Os nervos cavernosos então se ramificam do plexo pélvico em direção ao pênis. A estimulação do plexo pélvico e do nervo cavernoso induz ereção, enquanto que a estimulação do tronco simpático causa detumescência (Sakka & Lue, 2004).

A via somatosensorial origina-se de receptores sensoriais localizados na pele do pênis, da glândula, da uretra e no interior do corpo cavernoso. Na glândula do pênis humano há grande número de terminações aferentes (terminações nervosas livres e receptores corpusculares) (Halata & Nunger, 1986). As fibras nervosas que partem dos receptores

convergem para o nervo dorsal do pênis que se unem a outros nervos formando o nervo pudendo. Este último adentra a coluna espinhal via segmentos S2 a S4 para terminais nos neurônios espinhais e interneurônios na região cinzenta central do segmento lombo sacral. A ativação destes nervos sensoriais envia mensagens de dor, temperatura e toque pelas vias espinotalâmicas e espinoreticular para o tálamo e córtex sensorial, desencadeando a percepção sensorial. O núcleo de Onuf, do 2º ao 4º segmento sacral, é o centro da inervação somatomotora peniana. Estes nervos dirigem-se através dos nervos sacrais para o nervo pudendo para inervar os músculos ísquios e bulbo cavernosos. A contração do músculo isquiocavernoso participa da fase rígida da ereção, ao passo que a contração rítmica do músculo bulbo cavernosa é necessária para a ejaculação (Dean & Lue, 2005).

O suprimento de sangue para o pênis deriva-se principalmente da artéria pudenda interna. Na maioria dos homens, esta artéria origina-se de uma das divisões do tronco isqueopudendo da artéria ilíaca interna ao nível da junção sacro-ilíaca. Após atravessar o tronco perineal no Canal de Alcock, a artéria pudenda interna origina a artéria peniana, a qual se subdivide na porção terminal em quatro ramos, designados artérias dorsal, uretral (esponjosa), cavernosa e bulbar. A artéria dorsal adentra o pênis, sendo responsável pela rigidez da glândula peniana durante a ereção. A artéria esponjosa (ou uretral) corre longitudinalmente através do corpo esponjoso lateral até a uretra. Durante seu curso, abastece o corpo esponjoso, tecido uretral e glândula peniana. A artéria cavernosa do pênis corresponde a um vaso bastante estreito que adentra o pênis juntamente com as veias e os nervos cavernosos. Após adentrar os corpos cavernosos, a artéria cavernosa divide-se em múltiplas ramificações terminais conhecidas como artérias helicinais, assim conhecidas devido ao seu aspecto espiralado durante o estado flácido. Estas artérias abastecem os

espaços sinusoidais. A artéria bulbar adentra o bulbo do pênis logo após sua origem, fornecendo sangue à glândula e ao bulbo uretral proximal (Yiee *et al.*, 2010; Hsieh *et al.*, 2012).

O pênis é drenado por três subdivisões de veias: superficiais, intermediárias e profundas. A drenagem venosa dos corpos cavernosos ocorre através das vênulas, localizadas entre a periferia do tecido erétil e a túnica albugínea. As vênulas se fundem para formar as veias emissárias maiores as quais rompem a túnica albugínea, e drenam em veias penianas extra-túnicas denominadas veias cavernosa e crural (Puech-leao *et al.*, 1987; Krane *et al.*, 1989). O conjunto de veias intermediárias emerge da glândula peniana e forma o plexo retro coronal que drena na veia dorsal. Uma série de veias emissárias e circunflexas dos corpos cavernosos drena na veia dorsal profunda, a qual corre no sentido proximal na linha média entre os dois corpos cavernosos para esvaziar o plexo periprostático. O sistema venoso profundo drena tanto os corpos cavernosos quanto o corpo esponjoso. Os espaços cavernosos são drenados através de um conjunto de veias emissárias que rompem a túnica albugínea. Nas posições médias e distais, tais veias se fundem para formar as veias circunflexas, as quais se esvaziam na veia dorsal profunda. Na região proximal do pênis, as veias emissárias formam a veia cavernosa (veia profunda do corpo cavernoso), que atinge a veia pudenda interna. O corpo esponjoso drena através de um conjunto de veias uretrais e bulbares (Hsieh *et al.*, 2012).

Os sinusóides são espaços formados irregularmente por trabéculas e consistem de bandas de músculo liso, fibras elásticas, colágeno e um tecido frouxo contendo numerosas arteríolas e nervos. Estes sinusóides contêm sangue, sendo considerados unidades contráteis

intrinsecamente ativos sensíveis aos estímulos neurológicos; dessa maneira, possuem papel fundamental nos mecanismos de ereção e detumescência (Dean & Lue, 2005)..

Durante o estado flácido, as arteríolas e os sinusóides estão contraídos, devido principalmente, à ativação de receptores α -adrenérgicos, exercendo resistência máxima ao influxo arterial. Neste estado, apenas pequena percentagem de sangue adentra os corpos cavernosos com propósitos nutricionais (Traish *et al.*, 1999). Ao mesmo tempo em que os sinusóides estão contraídos, as veias drenam livremente para veias extra-penianas.

Neste estado, a musculatura lisa trabecular dos corpos cavernosos e das artérias cavernosas e helicinais se mantém em contração permanente. As trabéculas são drenadas pelas vênulas emissárias que se comunicam com as veias cavernosas. Neste estado flácido, a pO_2 varia de 20 a 40 mmHg no pênis (Kim *et al.*, 1993). Quando o bloqueio da atividade simpática se instala, essas musculaturas relaxam (tumescência), permitindo o influxo arterial e aumento progressivo da pressão sangüínea intracavernosa. Assim, a dilatação das artérias cavernosa e helical levam ao aumento do fluxo sangüíneo nos espaços lacunares, ao mesmo tempo em que o relaxamento do músculo liso trabecular dilata os espaços lacunares causando expansão do pênis. O influxo de sangue arterial está associado a aumento na pO_2 (90-100 mmHg) durante o estado de tumescência (Kim *et al.*, 1993). A elevação da pressão sangüínea ao nível das artérias helicinais promove a expansão do músculo liso trabecular contra a túnica albugínea. Este evento comprime o plexo de vênulas sub-túnicas, reduzindo o efluxo venoso no espaço lacunar; dessa forma, o pênis é mantido rígido através do mecanismo de oclusão venosa (Krane *et al.*, 1989; Andersson, 2011).

1.2. Contração do corpo cavernoso e flacidez peniana

O grau de contração do músculo liso do corpo cavernoso determina os estados funcionais de flacidez peniana, tumescência, ereção ou detumescência. O balanço entre fatores contráteis e relaxantes é controlado, por sua vez, por mecanismos centrais e periféricos (Andersson, 2011). A noradrenalina e a endotelina-1 (ET-1) estão entre os vários transmissores e mediadores que contribuem para a contração do tecido erétil peniano (Gratzke *et al.*, 2010; Andersson, 2011).

A neurotransmissão noradrenérgica (simpática) desempenha um papel essencial na regulação do tônus do músculo liso dos corpos cavernosos. Os vasos penianos e o músculo liso cavernoso recebem uma vasta inervação noradrenérgica, que mantém o estado flácido, principalmente através da atividade tônica destes nervos, causando liberação maciça de noradrenalina. Uma vez liberada, a noradrenalina estimula α 1-adrenoceptores (α 1-AR), induzindo contração da vasculatura peniana e do músculo liso trabecular do corpo cavernoso (Andersson, 2011).

Os mecanismos intracelulares decorrentes da atividade contrátil evocada pela ativação de α 1-AR pela noradrenalina incluem a ativação da fosfolipase C, a qual cataliza a clivagem de fosfatidilinositol em inositol trisfosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), aumentando-se assim os níveis intracelulares de cálcio. Subsequentemente, o cálcio se liga à calmodulina, a qual ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLC₂₀), levando ao aumento expressivo de fosforilação da MLC₂₀. Durante este processo, a MLC₂₀ fosforilada interage com a α -actina resultando na contração do músculo liso (Berridge, 2008; Gratzke *et al.*, 2010). Evidências sugerem que no corpo cavernoso a atividade contrátil evocada pela

ativação de $\alpha 1$ -AR está ligada à via da Rho/Rho-quinase. A Rho-quinase ativada fosforila a subunidade regulatória da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), resultando em inibição da atividade da MLCP, levando conseqüentemente a um aumento na contratilidade da musculatura lisa (Gur *et al.*, 2010; Gratzke *et al.*, 2010).

1.3. Relaxamento de corpo cavernoso e ereção peniana: Importância do óxido nítrico (NO) na ereção peniana

O NO é o principal neurotransmissor de um sistema de transdução de sinais que atua no pênis para mediar a resposta erétil (Lucas *et al.*, 2000; Andersson, 2011). As enzimas responsáveis pela formação do NO, referidas como óxido nítrico sintases (NOS), são encontradas nas fibras nitrérgicas (nNOS) e células endoteliais (eNOS) do tecido erétil. Essas enzimas catalisam o metabolismo da L-arginina, formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do produto intermediário N^o-hidroxi-L-arginina (Ignarro & Murad, 1995). No rato (Hedlund *et al.*, 1999), camundongo (Mizusawa *et al.*, 2011) e no homem (Leone *et al.*, 1994), a nNOS está localizada no plexo pélvico, nervos cavernosos e seus terminais nervosos, além de nervos penianos dorsais e plexos nervosos na adventícia de artérias cavernosa e dorsal. Além disso, o endotélio libera NO em resposta à ACh, bradicinina e força de cisalhamento (Saenz de Tejada *et al.*, 1988; Burnett, 1994; Teixeira *et al.*, 1998). Observou-se que a vasodilatação das artérias helicinais causada pela despolarização do nervo cavernoso leva à liberação de NO do endotélio sinusóide, como conseqüência do aumento do fluxo sangüíneo (Musicki *et al.*, 2004). Desta forma, a função erétil parece não ser mediada exclusivamente pelo NO oriundo de fibras nitrérgicas. O

aumento da força de cisalhamento evocado durante a resposta erétil estimula a fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K), ativando a proteína quinase B (Akt) que, por sua vez, fosforila a eNOS no sítio regulatório Ser-1177 levando à geração do NO no endotélio. Assim, acredita-se que a enzima nNOS inicia a resposta erétil enquanto que a eNOS concomitantemente à nNOS atua na manutenção do estado erétil (Hurt *et al.* 2002; 2012).

Diversos estudos mostraram que inibidores da NOS têm a capacidade de bloquear o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso induzido por estimulação elétrica das terminações NANC em espécies animais como coelho (Ignarro *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991), cão (Krane *et al.*, 1989), cavalo (Recio *et al.*, 1998), macaco (Okamura *et al.*, 1998), rato (Hedlund *et al.*, 1999), camundongo (Mizusawa *et al.*, 2001) e humanos (Ignarro *et al.*, 1990; Holmquist *et al.*, 1991; 1992; Bush *et al.*, 1992; Kirkeby *et al.*, 1993; Leone *et al.*, 1994). Após a estimulação elétrica do corpo cavernoso, observaram-se níveis aumentados de nitritos, nitratos e citrulina em coelho e humanos (Ignarro *et al.*, 1990; Rajfer *et al.*, 1992; Leone *et al.*, 1994). O NO, bem como doadores de NO, relaxam preparações de tecido erétil de humanos e coelhos (Rajfer *et al.*, 1992; Holmquist *et al.*, 1993; Christ *et al.*, 1995) e causa tumescência em cães, gatos, macacos e humanos (Wang *et al.*, 1994; Hellstrom *et al.*, 1994).

Sabe-se que ao ser liberado de fibras nitrérgicas ou endotélio, o NO se difunde para células musculares lisas adjacentes, ligando-se ao seu receptor fisiológico intracelular, a guanilato ciclase solúvel (GCs). Esta ligação ocorre diretamente no grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His₁₀₅ axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional que leva à ativação da GCs (Lucas *et al.*,

2000). A ativação desta enzima pelo NO leva à conversão de guanosina trifosfato (GTP) no segundo-mensageiro, GMPc. O GMPc ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), levando à redução da concentração de cálcio intracelular, causando o relaxamento da musculatura lisa e, conseqüentemente, a ereção peniana. O GMPc é hidrolisado a GMP pela ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), cessando assim a resposta erétil (Lucas *et al.*, 2000; Toda *et al.*, 2005). Atualmente, a principal terapia para a DE envolve o tratamento oral com inibidores de PDE5 (Goldstein *et al.*, 1998; Corbin *et al.*, 2004). O primeiro inibidor de PDE5 aprovado pela *Food Drug Administration* (FDA) foi o sildenafil (Viagra™), seguido do vardenafil (Levitra™) e tadalafil (Cialis™).

1.4. Disfunção erétil, envelhecimento e estresse oxidativo

A etiologia da DE é multifatorial e complexa, podendo ser de origem orgânica, psicogênica, ou a associação de ambas. Na DE orgânica, as causas mais comuns são de origem vasculogênica. Pacientes que apresentam doença vascular estão predispostos a desenvolver DE vasculogênica (Shamloul *et al.*, 2013; Bortolotti *et al.*, 1997; Jeremy & Mikhailidis, 1998, Sullivan *et al.*, 1999). As alterações da reatividade da musculatura lisa cavernosa estão associadas à diminuição da biodisponibilidade do NO e aumento da contratilidade da musculatura lisa.

O processo de envelhecimento acarreta alterações estruturais nos corpos cavernosos de humanos como aumento de colágeno, fibrose e redução da densidade volumétrica das células musculares lisas. Essas mudanças parecem contribuir para os danos vasculares, causando redução da função erétil (Jevtich *et al.*, 1990; Ferrer *et al.*, 2009; Tomada *et al.*,

2010). Estudos *in vivo* realizados com ratos idosos (19-22 meses) mostraram redução da pressão intracavernosa (Musicki *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2006). Estudos funcionais *in vitro* mostraram redução do relaxamento nitrérgico e do relaxamento dependente de endotélio em coelhos de 20, 36 e 48 meses (Angulo *et al.*, 2003; Numao *et al.*, 2007), assim como em ratos de 17 meses (Nunes *et al.*, 2012). Além disso, a atividade e a expressão da NOS são menores em corpos cavernosos de animais idosos (Musicki *et al.*, 2005; Bivalacqua *et al.*, 2007). Estudos realizados em corpos cavernosos de ratos de meia-idade mostraram redução da atividade da NOS e redução do relaxamento nitrérgico e dependente de endotélio (Hosogai *et al.*, 2003; Gur *et al.*, 2005). Confirmando a associação entre envelhecimento e DE.

O processo de envelhecimento provoca um desequilíbrio entre a produção das ERO e a capacidade antioxidante do tecido (Wei & Lee, 2002; El Assar *et al.*, 2013). A produção excessiva de ERO leva a disfunções celulares, peroxidação lipídica e mutagenicidade do DNA, podendo causar danos celulares irreversíveis e morte celular (Sawyer *et al.*, 2002; Giordano *et al.*, 2005; Murdoch *et al.*, 2006; Takimoto & Kass 2007). Vários estudos mostram que a produção excessiva de ERO induz à disfunção endotelial em animais (Van der loo *et al.*, 2000; Csiszar *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Ungvari *et al.*, 2007; Idris Khodja *et al.*, 2012) e humanos idosos (Donato *et al.*, 2007; Jablonski *et al.*, 2007).

As principais ERO incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-), os quais participam de reações bioquímicas em condições fisiológicas ou patológicas (Giordano *et al.*, 2005). O O_2^- é produzido pelas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases, xantina oxidase, eNOS desacoplada e cadeia respiratória mitocondrial (Frey *et al.*, 2009; Sawyer *et al.*, 2002; Giordano *et al.*,

2005; Murdoch *et al.*, 2006). Uma das consequências do aumento do estresse oxidativo no envelhecimento é a inativação do NO pelas altas concentrações de O_2^- (Sun *et al.*, 2004; Adler *et al.*, 2006). O NO pode reagir com o O_2^- para produzir o peroxinitrito ($ONOO^-$), contribuindo assim para o surgimento de várias condições patológicas como aterosclerose e isquemia (Pacher & Szabó, 2006; Pacher *et al.* 2007). A inativação direta do NO, em grande parte pelo O_2^- , pode assim contribuir para a redução do relaxamento dos corpos cavernosos (Bivalacqua *et al.*, 2005).

Em condições fisiológicas, as células possuem um sistema antioxidante eficiente que atua contra o acúmulo das ERO. O sistema antioxidante é formado por enzimas antioxidantes intracelulares, como a catalase, a glutathione peroxidase, a superóxido dismutase (SOD), e antioxidantes não-enzimáticos como as vitaminas E, C, beta-caroteno e ácido lipóico (Nordberg & Arner 2001; Giordano *et al.*, 2005). Dentre estes antioxidantes, a SOD é considerada a principal enzima envolvida na defesa do organismo contra o O_2^- . A SOD atua convertendo o O_2^- para H_2O_2 , que posteriormente é convertida pela catalase e/ou glutathione em água (Takimoto & Kass 2007; Frey *et al.*, 2009). De fato, a redução da atividade da SOD tem sido relacionada ao processo de envelhecimento, contribuindo para as altas concentrações de O_2^- (Li *et al.*, 2010). Em corpos cavernosos de ratos idosos, a redução da atividade da SOD tem sido recentemente relacionada à DE (Helmy *et al.*, 2012).

1.5. NADPH oxidase, apocinina e disfunção erétil

Em condições patológicas, a NADPH oxidase (Nox) é a principal precursora para a formação de grandes quantidades de O_2^- intravascular (Pendyala *et al.*, 2009). Existem 7 isoformas da Nox que são denominadas Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2, sendo que atualmente a gp91^{phox} é denominada Nox2. A Nox2 foi o protótipo para seus homólogos e, está é um complexo enzimático constituído por duas subunidades ligadas à membrana, a gp91^{phox} (Nox2) e p22^{phox}, e três subunidades citosólicas, p40^{phox}, p47^{phox} e p67^{phox}, e uma pequena GTPase (Rac 1 ou Rac2). A ativação do complexo NADPH oxidase inicia-se pela fosforilação das subunidades citosólicas, levando à translocação dessas para a membrana, juntamente com a Rac, formando assim o complexo ativo. A transferência do elétron do NADPH para a molécula de oxigênio no sítio catalítico resulta na formação do O_2^- (Bokoch *et al.*, 2009; Lessègue *et al.*, 2012). O aumento da expressão e atividade do complexo NADPH oxidase tem sido implicados no envelhecimento (Park *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; El Assar *et al.*, 2013), assim como em doenças cardiovasculares como hipertensão arterial, infarto do miocárdio, danos oriundos de isquemia e reperfusão, aterosclerose, diabetes mellitus e hiperlipidemia (Jeremy *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004, Li & Shah 2004; Hayashi *et al.*, 2005; Muzaffar *et al.*, 2005). Estudos anteriores relataram que o aumento da expressão da NADPH oxidase está associado à DE em animais hipercolesterolêmicos, hipertensos e diabéticos (Jin *et al.*, 2008; Claudino *et al.*, 2010; Musicki *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

A apocinina, conhecida também como acetovanilona, é utilizada experimentalmente como um inibidor não seletivo da NADPH oxidase (Jin *et al.*, 2008; Brennan *et al.*, 2009;

Musicki *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Dayal *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). O mecanismo pelo qual a apocinina inibe a NADPH oxidase não está totalmente esclarecido, mas parece envolver inibição da translocação das subunidades citosólicas p67^{phox} e p47^{phox} para a membrana, impedindo a formação do complexo NADPH oxidase (Stolk *et al.*, 1994). O tratamento crônico com apocinina reverte a DE em ratos hipertensos pela infusão de angiotensina II, assim como o aumento da expressão protéica para a p47^{phox} no tecido erétil (Jin *et al.*, 2008). O tratamento com apocinina também reverte o aumento da expressão gênica para p67^{phox} e p47^{phox} no corpo cavernoso, e a DE em ratos diabéticos (Li *et al.*, 2012). Em camundongos deficientes para os receptores de LDL tratados com dieta rica em colesterol, o tratamento crônico com apocinina reduz o aumento do estresse oxidativo e reverte o aumento da expressão protéica para p67^{phox} e p47^{phox} no tecido erétil, sem modificar o aumento da expressão protéica para a gp91^{phox} (Musicki *et al.*, 2010).

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A DE constitui um problema de saúde pública pela sua prevalência, impacto na qualidade de vida do homem e pelo fato de estar associada a várias comorbidades clínicas. Estudos recentes vêm sugerindo que a DE é uma manifestação precoce ou fator preditivo positivo para doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos mostram que a prevalência de DE aumenta significativamente com o envelhecimento, atingindo grande percentagem em homens de meia-idade. Uma causa em potencial para complicações vasculares decorrentes do envelhecimento é o aumento dos níveis de ERO, que pode inativar o NO, produzindo impotência sexual masculina. Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito do estresse oxidativo associado ao envelhecimento na função erétil de ratos de meia-idade. Assim, propusemos a hipótese que o aumento da produção de O_2^- nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade contribui para a DE nesta faixa etária. Acreditamos que o presente trabalho poderá repercutir positivamente não somente para o esclarecimento da fisiopatologia da DE em sua fase precoce, como também para a melhora da terapêutica e prevenção.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

1. Avaliar as alterações funcionais e moleculares da via de sinalização NO – GCs – GMPc – PDE5 nos corpos cavernosos em ratos de meia-idade.
2. Investigar o papel do estresse oxidativo sobre os mecanismos contráteis e relaxantes de corpos cavernosos em ratos de meia-idade.

Objetivos específicos

- Avaliar a pressão intracavernosa em ratos jovens e de meia-idade;
- Realizar curvas concentração-resposta para a ACh, SNP, BAY 41-2272, sildenafil e 8-Br-GMPc, assim como o relaxamento nitrérgico;
- Realizar curvas concentração-resposta para a fenilefrina, assim como contração neurogênica *in vitro* e expressão protéica para tirosina hidroxilase;
- Avaliar os níveis de GMPc e de expressão protéica da nNOS, eNOS total, eNOS fosforilada (serina-1177 e treonina-495) e GCs (subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$) em corpo cavernoso;
- Realizar ensaios funcionais na presença de SOD ou apocinina, assim como medidas de ERO e de expressão gênica da gp91^{phox} e SOD-1 em corpo cavernoso;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram usados ratos machos da linhagem Wistar jovens (3,5 meses) e de meia-idade (10 meses). Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos à 24°C em ciclos de claro/escuro (12/12 h), com ração e água *ad libitum* no Departamento da Farmacologia da FCM/UNICAMP. Os protocolos experimentais encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (2110-1).

Tratamento com apocinina

Os animais jovens e de meia-idade foram tratados com apocinina (aproximadamente 85 mg/rato/dia) por quatro semanas, de acordo com estudo prévio (Jin *et al.*, 2008). A apocinina foi dissolvida na concentração de 10 mM na água de beber. A ingestão hídrica inicialmente foi medida a fim de se definir a ingestão diária de água pelos ratos, que em nossas condições de biotério foi de aproximadamente 50 ml/dia/rato. Os ratos jovens foram submetidos às mesmas condições experimentais, porém receberam apenas água de torneira.

2.2. Preparo dos corpos cavernosos isolados de ratos

Os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg i.p.) e exsanguinados por secção dos vasos cervicais. O pênis foi retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: NaCl, 118;

NaHCO₃, 25; glicose, 5,6; KCl, 4,7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄.7H₂O, 1,17 e CaCl₂.6H₂O, 2,5. Após remoção do tecido conjuntivo, o tecido cavernoso foi dissecado e isolado. Cada pênis forneceu dois segmentos de corpos cavernosos dissecados (aproximadamente 2 x 0,3 x 0,2 cm), os quais foram montados em câmaras de incubação para órgão isolado (10 ml) preenchidas com solução Krebs-Henseleit, e continuamente gaseificadas com O₂:CO₂ (95:5 %), à temperatura de 37° C (pH 7,4). Os segmentos de corpos cavernosos foram suspensos entre um transdutor de força de unidade fixa. A tensão aplicada aos tecidos (5 mN) foi periodicamente ajustada até obter-se a estabilização dos mesmos (60 min). As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália).

2.3. Curvas concentração-resposta

Para analisar a resposta relaxante dos corpos cavernosos, realizou-se a pré-contracção tecidual com o agonista α 1-adrenérgico, fenilefrina (10 μ M). Após a estabilização da resposta contrátil, foram construídas curvas concentração-resposta ao agonista muscarínico, acetilcolina (ACh; 10 nM -10 mM); ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP; 10 nM - 10 mM); ao estimulador direto da GCs independente de NO, BAY 41-2272 (1 nM - 10 μ M); ao inibidor da PDE5, sildenafil (1 nM - 10 μ M) e ao análogo permeável do GMPc, 8-Br-GMPc (10 nM - 300 μ M). As respostas relaxantes induzidas por estes agentes também foram avaliadas em tecidos pré-incubados com SOD (75 U/ml, 15 min) ou apocinina (inibidor da NADPH oxidase; 100 μ M, 30 min), exceto para o 8-Br-GMPc. O

relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Avaliou-se também a resposta contrátil construindo-se curvas concentração-resposta cumulativa à fenilefrina (10 nM - 100 μ M). A resposta contrátil induzida por este agente também foi avaliada em tecidos pré-incubados com SOD (75 U/ml) ou apocinina (100 μ M). As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações da droga em questão em uma ou meia unidade logarítmica.

A resposta relaxante foi calculada em relação à contração máxima produzida pela fenilefrina (10 μ M), a qual foi tomada como 100%. A resposta contrátil foi calculada em mN. Os valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) foram calculados pela seguinte equação:

$E = E_{max} / [1 + (10^c / 10^x)^N + \Phi]$, onde E é elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima resposta que o agonista pode produzir; “c” é o logaritmo da EC_{50} , que é a concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x” é o logaritmo da concentração do agonista; “N” significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max} , $\log EC_{50}$ e o “n” foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), considerando o parâmetro Φ como zero.

2.4. Estimulação elétrica

Para o estudo da estimulação elétrica (EFS), os corpos cavernosos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos de forma paralela. Os tecidos foram estimulados

eletricamente a uma voltagem de 50 V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo, intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, duração da estimulação de 10 segundos nas frequências de 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 3 minutos entre os estímulos.

As respostas relaxantes à EFS (1-32 Hz) foram obtidas em tecidos previamente tratados por 30 min com guanetidina (30 μ M) para depletar os estoques de noradrenalina, e atropina (1 μ M) para bloquear a resposta muscarínica. Em seguida, os tecidos foram pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M), após o qual realizou-se a curva frequência-resposta (4-32 Hz). A resposta contrátil induzida pela estimulação elétrica foi também avaliada em tecidos previamente tratados por 30 min com L-NAME (100 μ M, inibidor não seletivo da NOS) e atropina (1 μ M).

2.5. Monitoramento da pressão intracavernosa (experimentos “in vivo”)

Os ratos foram anestesiados com uretana (1,3 g/Kg). A carótida direita foi canulada para monitoração contínua da pressão arterial média (PAM) e o corpo cavernoso direito foi canulado para registro simultâneo da pressão intracavernosa (ICP), através de transdutores de pressão (Grass, Astro-Med Industrial Park, EUA). Foi feita uma incisão na cavidade abdominal para exposição do nervo cavernoso, localizado na porção dorsolateral da próstata. Eletrodos bipolares de aço inoxidável foram conectados a um estimulador Grass SD9 (Grass, Astro-Med Industrial Park, EUA.) e posicionados no nervo cavernoso. Foi feito após 10 min a estimulação elétrica do nervo (5 ms de duração, 6 V, durante 45 s) em diferentes frequências (2, 4, 6 e 8 Hz, com intervalo de 3 min entre as frequências). Todos os dados de pressão foram coletados para análise utilizando-se o sistema PowerLab 400 de

aquisição de dados (Software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). A PAM e a ICP foram monitoradas por pelo menos 10 min antes do início dos experimentos, para se assegurar da estabilidade das medidas. Foi então realizada a estimulação do nervo cavernoso para obtenção das respostas eréteis. A razão ICP/PAM foi utilizada para avaliar a função erétil *in vivo*. O cálculo foi realizado dividindo o pico máximo da ICP (para cada frequência utilizada) pela PAM.

2.6. Determinação dos níveis de GMPc

Para a determinação dos níveis de GMPc em homogenatos de corpos cavernosos de ratos, os tecidos foram equilibrados durante 20 min em solução de Krebs continuamente oxigenada à 37°C. Os tecidos foram então estimulados por 10 min com SNP (10 µM) ou BAY 41-2272 (10 µM). Alguns tecidos foram incubados com SOD (75 U/mL, 15 min), apocinina (100 µM, 30 min) ou ODQ (10 µM, 30 min) antes da adição de SNP ou BAY 41-2272. Em seguida, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, pulverizados, homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA, 5%) e centrifugados à 1500 g por 10 min à 4 °C. O TCA foi extraído das amostras através de três lavagens com solução de éter saturado com água. A preparação do *tracer*, amostras, padrões e incubação com anticorpo foram feitas conforme descrito no kit disponível comercialmente (Cayman Chemical Cyclic GMP EIA kit, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata e o peso do *pellet* foi utilizado para normalizar os dados que foram expressos em pmol/mg de tecido.

2.7. Técnica de RT-PCR em tempo real

2.7.1. Extração de RNA

Para a obtenção do RNA dos corpos cavernosos dos ratos, utilizamos o método de extração com o reagente TRIzol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), de acordo com as instruções do fabricante. Os corpos cavernosos e TRIzol foram incubados por 5 min à temperatura ambiente, para completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos. Duzentos µl de clorofórmio (CHCl₃) foram adicionados aos tubos. Os mesmos foram agitados vigorosamente e colocados à temperatura ambiente por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (19.000 g, 10 min à 4° C). Os sobrenadantes foram descartados e o “pellet” de RNA foi lavado com 800 µl de etanol 75%. Após centrifugação (14000 g, 5 min à 4° C), os sobrenadantes foram desprezados, e os tubos foram invertidos e apoiados sobre gazes para eliminar o resto de etanol. Posteriormente, o RNA foi dissolvido em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC), incubado à 55° C por 10 min e colocado em gelo para solubilização total do RNA. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,2 %. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S. Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80 °C.

2.7.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas Life Sciences): 3 µg de RNA foram tratados com DNase 1, RNase-free (Fermentas Life Science), na seguinte reação: 1U DNase I, 1X DNase *Reaction buffer with MgCl₂* (100 mM Tris-HCl, pH7,5; 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂), em volume final de 10 µL. A reação foi realizada por 15 min à temperatura ambiente e paralisada com 2,27 mM EDTA, incubando-se por 5 min à 65 °C.

Para síntese do cDNA, foram adicionados 1 µL de 100 mM *Oligo(dt) Primer* (volume de 12 µL) e incubado por 5 min à 65 °C. Adicionou-se então 20X *Reaction Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 250 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 50 mM DTT), 2 µL de 10mM dNTP Mix, 200U *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* e 200 U *RiboLock™ RNase Inhibitor* e incubado por 1 h/ 42 °C – 5min/70°C.

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio de PCR para amplificação do gene beta-actina (BAC). As reações realizadas foram: 1X tampão *Taq* polimerase, 1 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 µM *primer BAC forward* (5'–AAGAGATGGCCACGGCTGCT–3'), 200 µM *primer BAC reverse* (5' –TCGCTCCAACCGACTGCTGT – 3'), 2,5 U de *Taq* polimerase e aproximadamente 50 ng de cDNA, em volume final de 50 µL. O programa foi iniciado por 2 min/ 95 °C, seguido de 30 ciclos: 30 s/ 95° C – 45 s/ 50°C – 1 min/ 72 °C, sendo finalizado por 7 min/ 72 °C. Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para a verificação da amplificação de 640 pb.

2.7.3. Desenho dos primers

Os primers utilizados nas reações foram desenhados com o uso do site www.invitrogen.com e com o software “Primer Express” (Applied Biosystems), analisados no programa Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para verificação das condições de formação de estruturas como hairpins e dimers. Os primers utilizados neste estudo estão listados na tabela 1.

Tabela-1 – Sequência e concentração dos fragmentos amplificados de cada par de primer.

Gene	Sequência dos primers desenhados	Concentração
gp91 ^{phox} – F gp91 ^{phox} – R	5'-CATGCTGATCTTGCTGCCAGT-3' 5'-TGTCTTCGAATTCTGGTTGAG-3'	300 nM
SOD1 – F SOD1 – R	5'-TCAATATGGGGACAATACACAAG-3' 5'-GGACCGCCATGTTTCTTAGA-3'	150 nM
β -actin – F β -actin – R	5'-GCAATGAGCGGTTCCGAT-3' 5'-TAGTTTCATGGATGCCACAGGAT-3'	70 nM
GAPDH – F GAPDH – R	5'-CCTGCCAAGTATGATGACATCAA-3' 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	50 nM

2.7.4. Padronizações necessárias para o PCR quantitativo em tempo real

2.7.4.1. Concentração e eficiência do primer

Utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos primers (sense e anti-sense) na concentração final de 70, 150, 300 e 600 nM. Considerando-se que se utilizou a mesma quantidade de amostra em todas as reações, o Ct

não deve variar. Se o aumento da concentração de primer ocasiona diminuição de Ct, então a quantidade deste reagente na reação ainda é insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor Ct. A eficiência foi feita utilizando a concentração ótima de primer com 7 concentrações conhecidas de amostra, em escala logarítmica: 2 ng (2×10^0), 6,32 ng ($2 \times 10^{0,5}$), 20 ng (2×10^1), 63,2 ng ($2 \times 10^{1,5}$), 120 ng, 200 ng (2×10^2) e 632 ng ($2 \times 10^{2,5}$). Os resultados são utilizados para construção da curva padrão Ct versus quantidade de amostra. Assim, para que a qRT-PCR seja confiável e reprodutiva são necessárias que as amplificações apresentem 95-100% de eficiência de amplificação (coeficiente de correlação de Pearson ou R2, onde r deve ser >0,95, o qual é a reflexão da eficiência da amplificação da qRT-PCR), a cada ciclo em duplicata e inclinação da reta ou Slope entre -3,1 e 3,6. As concentrações utilizadas dos primers estão demonstradas na tabela 1. A eficiência dos *primers* foi de 99,9 %.

2.7.5. RT-PCR quantitativo em tempo real – “real time RT-PCR”

As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando-se o reagente SYBERGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems), que, além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCL2, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBERGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. Além disso, utiliza-se amostras de cDNA e primers específicos para o gene analisado. A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System® (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do

limite basal estabelecido (threshold) é denominado ciclo de threshold ou Ct. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct.

As reações realizadas continham 6 µl do reagente SYBERGreen PCR Master Mix[®], 5 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de primer determinada, perfazendo um volume final de 12 µl. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição à amostra. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95 °C/ 10 min, seguido de 45 ciclos: 95 °C/ 15 segundos – 60 °C/ 1 min. Ao final de uma amplificação normal adiciona-se um passo de degradação durante o qual a temperatura aumenta gradualmente de 60 °C para 95 °C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR Green. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de *melting temperature* entre os produtos de PCR amplificados; essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto.

2.7.6. Quantificação e normalização das amostras pelo método geNorm version

3.4

A expressão dos genes de interesse foi quantificada e normalizada com relação a dois genes controles ou calibradores (β -actina e GAPDH). Estes são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. Para tanto,

após a exportação dos valores dos CTs obtidos, para uma planilha Excel (Microsoft Corporation, USA), foi calculada a média aritmética do CT das duplicatas. A seguir foi obtida a quantidade de expressão (Q), por meio da fórmula $Q = E^{\Delta CT}$, onde E = eficiência de reação e $\Delta CT =$ menor CT observado – CT de cada amostra. Desta forma, a expressão gênica foi relacionada à amostra que apresentou maior expressão (menor CT observado). Os valores Q dos genes calibradores de cada amostra foram submetidos ao método geNorm (Program geNorm version 3.4) (Vandesompele *et al.*, 2002), que calcula a média geométrica entre eles, valor este denominado fator de normalização da amostra. A expressão normalizada de um dado gene de interesse em uma determinada amostra foi dada pela razão entre o valor Q do gene de interesse da amostra e o fator de normalização da mesma.

2.8. Western blotting

Os corpos cavernosos foram homogeneizados em tampão SDS utilizando-se homogeneizador Polytron PTA 20S (modelo PT 10/35; Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, EUA), operado em velocidade máxima. Os extratos foram centrifugados à $12000 \times g$, $4^{\circ}C$, durante 20 min para remover materiais insolúveis. As concentrações de proteína no sobrenadante foram determinadas através do método de Bradford. Quantidades iguais de proteína de cada amostra (20 μg) foram tratadas com tampão Laemmli contendo ditioeritrol (100 mM). As amostras foram aquecidas em banho com água fervente por 15 min e em seguida aplicadas em gel de poliacrilamida 10% + lauril sulfato de sódio 0,1% (SDS-PAGE) para separação das proteínas por eletroforese. A eletrotransferência das

proteínas para membrana de nitrocelulose foi realizada durante 60 min a 15 V (constante) em sistema semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Os sítios inespecíficos na membrana foram bloqueados com BSA (solução a 5% em tampão Tris-Salina - TBS, pH 7,4) durante 1 h. A seguir, as membranas foram incubadas de 15 a 18 horas à 4°C com anticorpos primários específicos para as diferentes isoformas das NOS (anti-nNOS de coelho, policlonal, diluição de 1:1000; anti-eNOS e fosfo-eNOS (ser-1177 e thr-495) de camundongo, monoclonais, diluição 1:2500), GCs (anti-subunidades $\alpha 1$ de coelho, policlonal, diluição 1:1000; anti-subunidades $\beta 1$ de coelho, policlonal, diluição 1:1000) e tirosina hidroxilase (TH; de cabra, policlonal, diluição 1:1000). A detecção foi realizada utilizando-se anticorpos primários específicos, anticorpos secundários HRP-conjugados e solução de luminol. O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa: 29 a 205 kDa). A intensidade das bandas, como uma medida da expressão da proteína, foi determinada por análise densitométrica mediante ao uso do Software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, EUA).

2.9. Dosagem de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A fluorescência resultante da oxidação da dihidroetidina (DHE) foi usada para avaliar a geração de ERO. Brevemente, os corpos cavernosos foram removidos e colocados em meio para congelamento, e em seguida congelados em gelo seco. Os corpos cavernosos foram cortados (30 μ M) em criostato e colocados em lâminas com silanina. As lâminas ficaram em placa quente (37° C) por 20 min. Os cortes foram circulados com caneta

hidrofóbica e incubados com tampão fosfato por 10 min a 37° C em câmara úmida. O tampão fosfato foi retirado. Os cortes foram incubados com DHE (10 µM) diluída em tampão fosfato por 30 min a 37° C em câmara úmida. A fluorescência dos cortes foi detectada em microscópio óptico (BX51, Olympus, Japão) com filtro para rodamina, com objetiva de 10X. A fluorescência vermelha proveniente dos produtos de oxidação da DHE foi analisada pelo software Image J (National Institute of Health, Bethesda-MD, EUA) e os resultados foram expressos como fluorescência dos núcleos marcados/mm². A fluorescência foi avaliada em corpos cavernosos pré-incubados com SOD (75 U/ml, 15 min) ou apocinina (inibidor da NADPH oxidase; 100 µM, 30 min) e de ratos tratados com apocinina na água de beber (85 mg/Kg/dia, por quatro semanas).

2.10. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão das médias (E.P.M.) de n experimentos indicados em cada caso. Para comparações múltiplas entre 4 grupos, foi usado o teste de análise de variância (ANOVA-uma via), seguido pelo teste de *Tukey*. Para comparação entre 2 grupos, usou-se o Teste t de *Student* não pareado. O programa GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas. Valores de P < 0.05 foram considerados significativos.

3. RESULTADOS

3.1. Relaxamento do corpo cavernoso em rato de meia-idade

3.1.1. Medidas de pressão intracavernosa

As estimulações elétricas do nervo cavernoso produziram aumento da pressão intracavernosa (ICP) dependentes da frequência, as quais foram significativamente menores ($P < 0.05$) no grupo meia-idade para todas as frequências estudadas (Figura 1A). Nenhuma mudança significativa foi observada para a pressão arterial média (PAM) em ratos de meia-idade em relação ao grupo jovem (Figura 1B).

3.1.2. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pela acetilcolina

O relaxamento dependente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito à ACh (10 nM – 10 mM) em corpos cavernosos de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). A potência (pEC_{50}) e a resposta máxima (E_{max}) da ACh foram significativamente ($P < 0.05$) menores nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade em comparação com os ratos jovens (Figura 2A, B; Tabela 2). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 μ M; Figura 2A) ou SOD (75 U/mL; Figura 2B) restaurou parcialmente ($P < 0.05$) a potência e a resposta máxima diminuídas da ACh em corpos cavernosos de ratos de meia-idade (Tabela 2). Nem a potência, nem a resposta máxima da ACh foi alterada nos corpos cavernosos de ratos jovens pré-incubados com apocinina (100 μ M) ou SOD (Tabela 2).

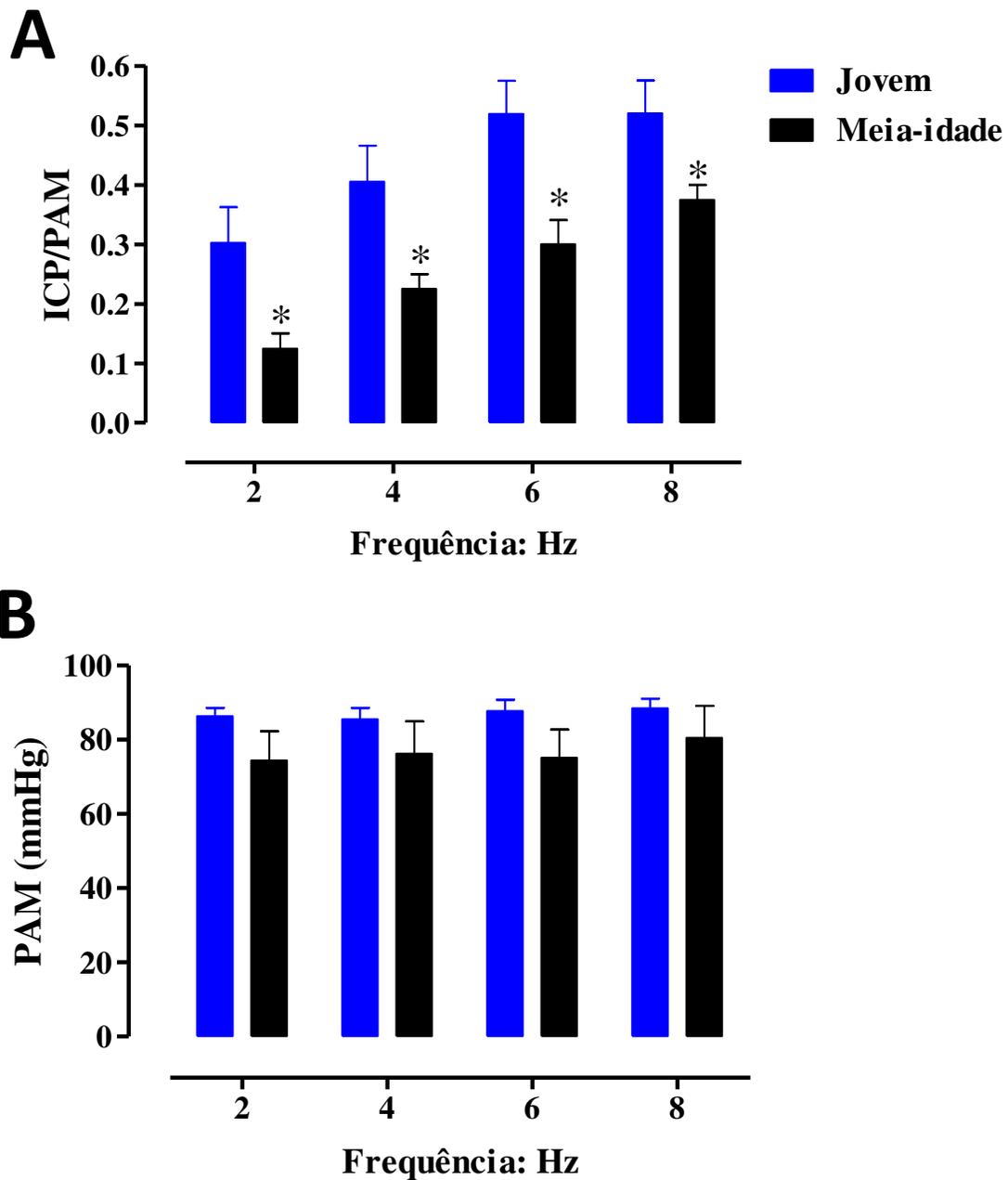


Figura 1. Pressão intracavernosa (ICP) em ratos jovens e de meia-idade. Razão pressão intracavernosa (ICP)/ pressão arterial média (PAM) (A). Valores de PAM (B). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem.

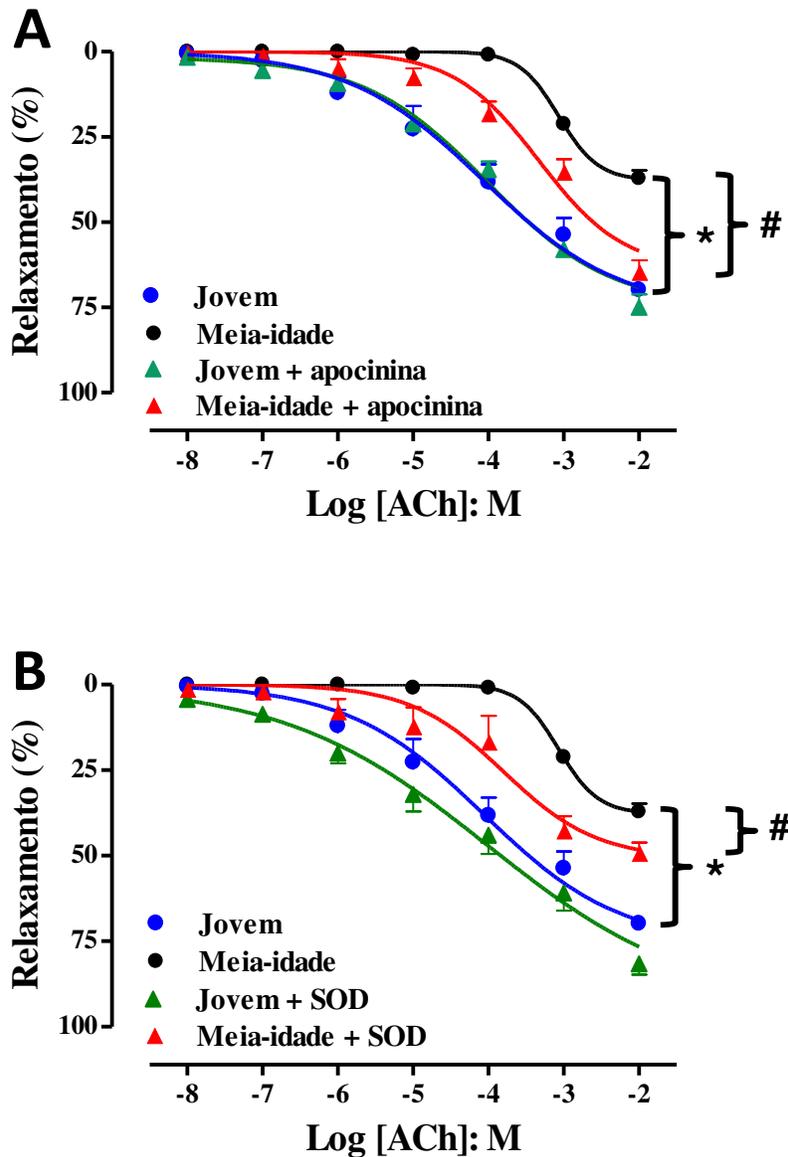


Figura 2. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade na presença de apocinina (A) ou SOD (B). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-6 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem; #P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado. As curvas à ACh nos grupos jovem e meia-idade, na ausência de tratamento, foram repetidas nos painéis A e B para melhor visualização dos resultados.

Tabela 2: Valores de potência (pEC₅₀) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade.

	Jovem		Meia-idade	
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (%)
ACh	4.06 ± 0.12	70 ± 1	3.06 ± 0.03 #	37 ± 2 #
ACh/Apo	4.01 ± 0.06	75 ± 4	3.32 ± 0.08 *#	64 ± 3 *
ACh/SOD	4.01 ± 0.11	81 ± 3	3.79 ± 0.17 *	49 ± 3 *#
SNP	5.37 ± 0.08	103 ± 2	4.31 ± 0.06#	88 ± 2 #
SNP/Apo	5.25 ± 0.09	102 ± 1	5.22 ± 0.08*	101 ± 1 *
SNP/SOD	5.55 ± 0.10	107 ± 3	5.43 ± 0.09*	105 ± 2 *
BAY	7.23 ± 0.05	103 ± 3	6.60 ± 0.05 #	92 ± 4
BAY/Apo	7.43 ± 0.03*	110 ± 5	7.48 ± 0.04 *	101 ± 4
BAY/SOD	7.70 ± 0.06*	106 ± 6	7.54 ± 0.04 *	114 ± 4
Sildenafil	7.32 ± 0.05	97 ± 4	6.69 ± 0.06 #	97 ± 2
Sildenafil/Apo	7.65 ± 0.03 *	97 ± 2	7.80 ± 0.04 *	97 ± 4
Sildenafil/SOD	7.69 ± 0.04 *	102 ± 4	7.72 ± 0.03 *	109 ± 1
8-Br-GMPc	5.31 ± 0.07	97 ± 5	5.26 ± 0.05	94 ± 1

Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10 nM – 10 mM), nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM – 10 mM), BAY 41-2272 (BAY, 1 nM – 10 µM), sildenafil (1 nM – 10 µM) e 8-Br-GMPc (10 nM – 300 µM), na ausência e na presença de apocinina (Apo, 100 µM) ou superóxido dismutase (SOD; 75 U/ml) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade. Os dados representam média ± E.P.M. para 5 – 6 animais. *P < 0.05 comparado com o respectivo grupo não tratado; #P < 0.05 comparado com o respectivo valor do grupo jovem.

3.1.3. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo nitroprussiato de sódio

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM – 10 mM) em corpos cavernosos de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 µM). A potência e a resposta máxima do SNP foram significativamente menores ($P < 0.05$) nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade em comparação com os ratos jovens (Figura 3A, B; Tabela 2). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 µM) ou SOD (75 U/mL) restaurou totalmente ($P < 0.05$) a potência e a resposta máxima diminuídas do SNP em corpos cavernosos de ratos de meia-idade (Figura 3A, B; Tabela 2). Nem a potência, nem a resposta máxima do SNP foi alterada nos corpos cavernosos de ratos jovens pré-incubados com apocinina (100 µM) ou SOD (75 U/mL) (Tabela 2).

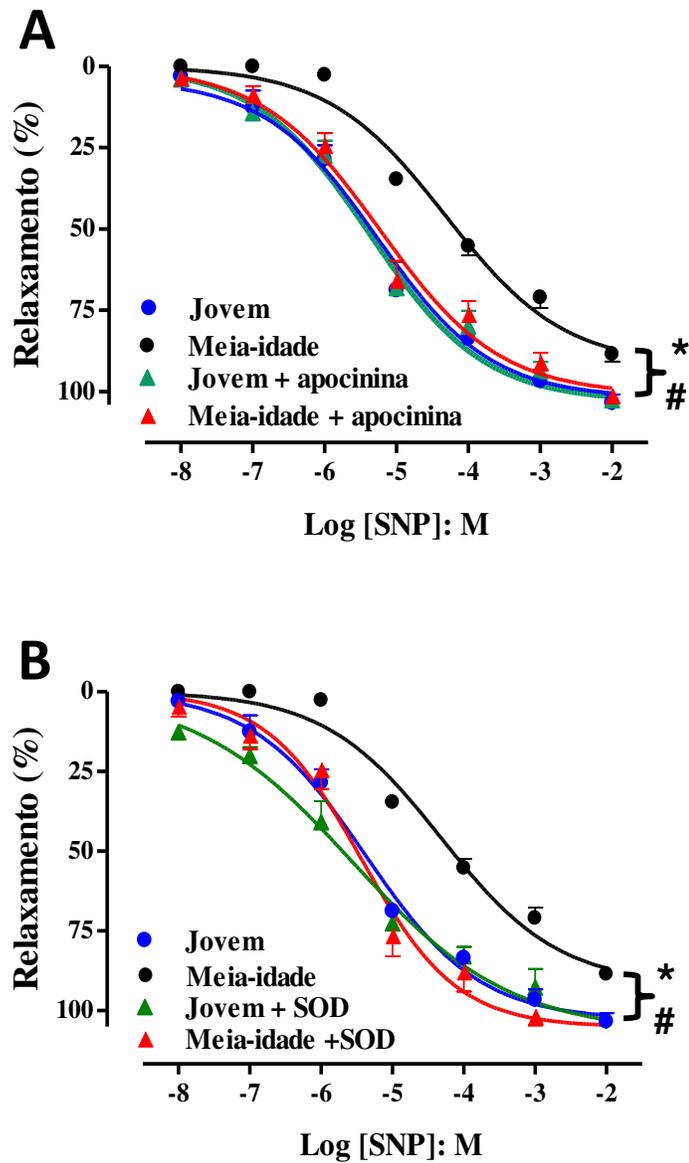


Figura 3. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade na presença de apocinina (A) ou SOD (B). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-6 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem; #P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado. As curvas para o SNP nos grupos jovem e meia-idade, na ausência de tratamento, foram repetidas nos painéis A e B para melhor visualização dos resultados.

3.1.4. Relaxamento nitrérgico

Os relaxamentos nitrérgicos foram avaliados em corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina (10 μM), pré-tratados com guanetidina (30 μM) e atropina (1 μM). A estimulação elétrica da preparação induziu relaxamentos frequência-dependentes (4-32 Hz). Os relaxamentos nitrérgicos foram significativamente menores nos tecidos de ratos de meia-idade, nas frequências de 16 e 32 Hz (Figura 4). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 μM ; Figura 4A) ou SOD (75 U/mL; Figura 4B) restaurou significativamente ($P < 0.05$) os relaxamentos nitrérgicos do grupo meia-idade. No grupo jovem, o tratamento com apocinina ou SOD não modificou o relaxamento nitrérgico, exceto na frequência de 4 Hz onde se notou aumento do relaxamento.

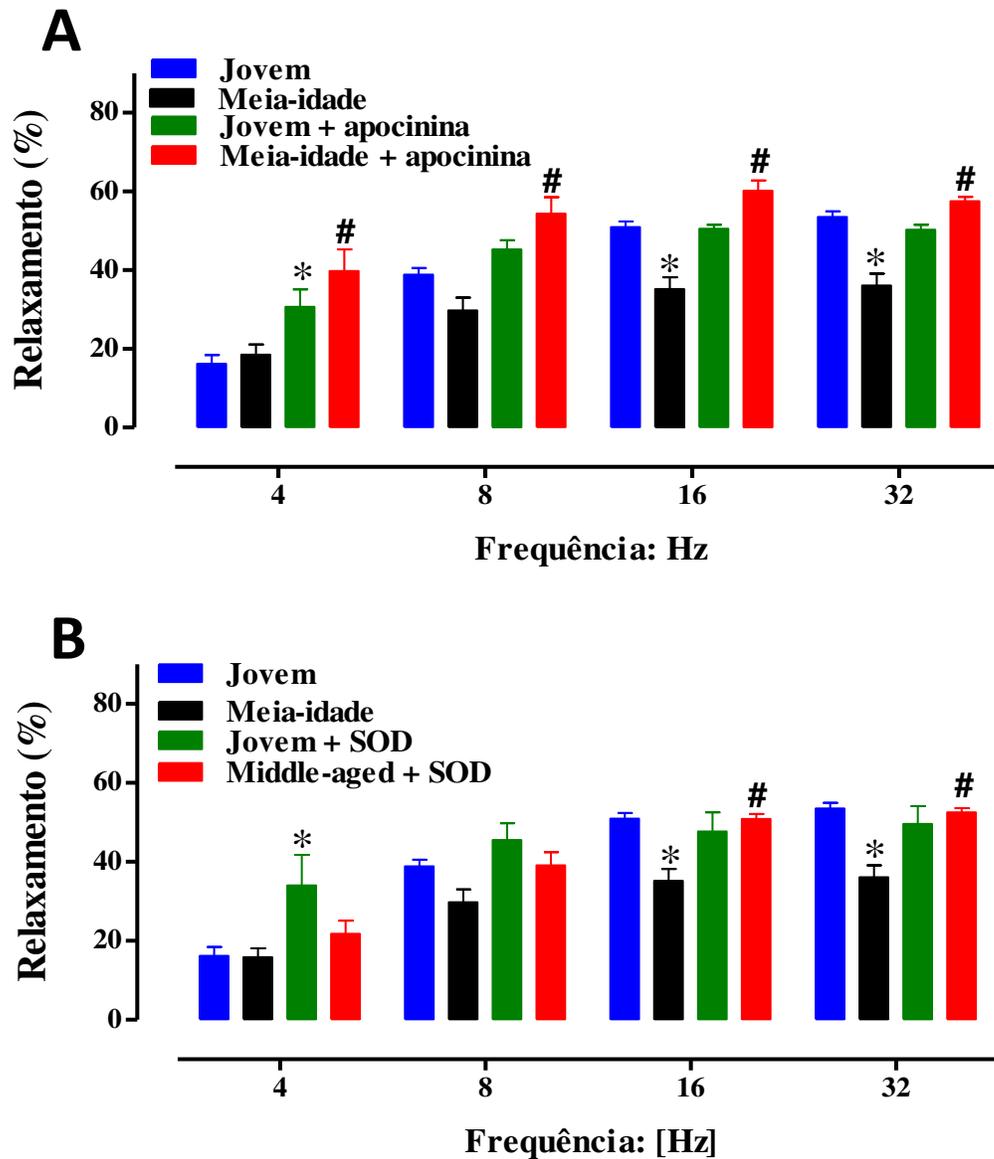


Figura 4. Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas (EFS; 4 – 32 Hz) em animais jovens e de meia-idade na presença de apocinina (A) ou SOD (B). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-9 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem; #P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado. As curvas para a EFS nos grupos jovem e meia-idade, na ausência de tratamento, foram repetidas nos painéis A e B para melhor visualização dos resultados.

3.1.5. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272

O relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 (estimulador direto da GCs por mecanismo independente de NO) foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito a este composto (1 nM – 10 μ M) em corpos cavernosos de ratos pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M). Os resultados mostraram um deslocamento significativo da curva concentração-efeito ao BAY 41-2272 para a direita nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade em comparação com os ratos jovens, sendo este de aproximadamente quatro vezes (Figura 5A, B; Tabela 2). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 μ M; Figura 5A) ou SOD (75 U/mL; Figura 5B) restaurou significativamente ($P < 0.05$) a potência do BAY 41-2272 em corpos cavernosos de ratos de meia-idade (Tabela 2). Nos ratos jovens, a apocinina e SOD também aumentaram a potência do BAY 41-2272; entretanto, este aumento foi em menor proporção comparado ao grupo meia-idade. A resposta máxima do BAY 41-2272 não foi modificada em nenhum dos grupos (Tabela 2).

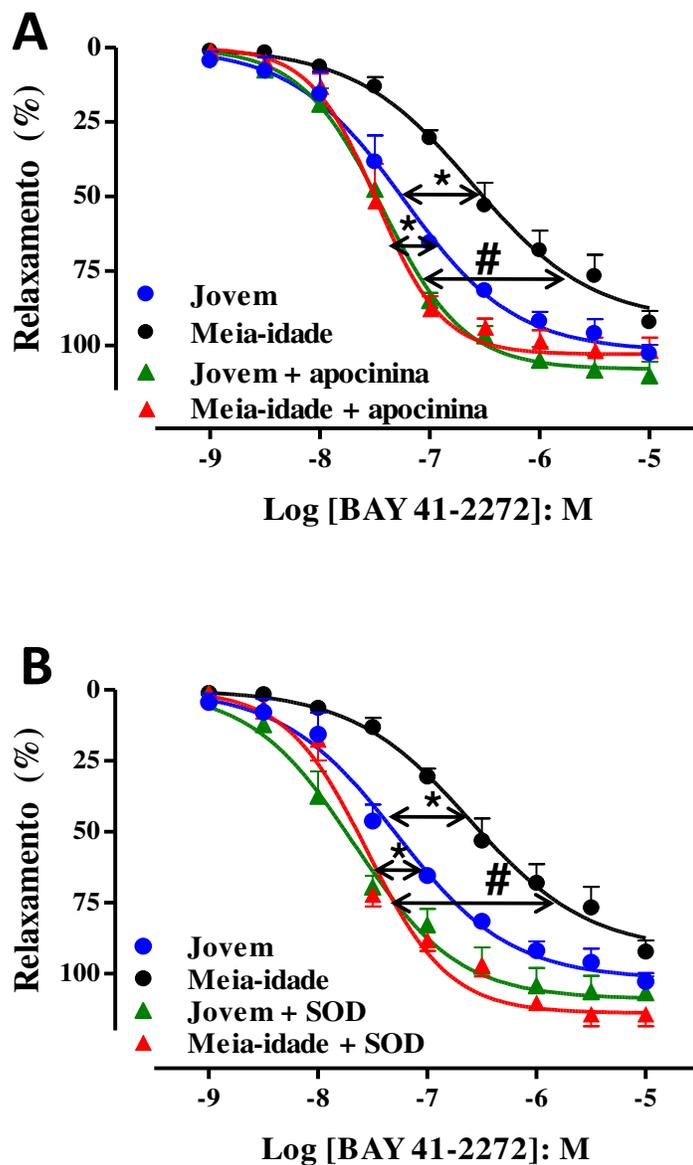


Figura 5. Curvas concentração-efeito ao BAY 41-2272 em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade na presença de apocinina (A) ou SOD (B). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-6 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem; #P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado. As curvas para o BAY 41-2272 nos grupos jovem e meia-idade, na ausência de tratamento, foram repetidas nos painéis A e B para melhor visualização dos resultados.

3.1.6. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo sildenafil

O relaxamento produzido pelo sildenafil (inibidor seletivo da PDE5) foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito a este agente (1 nM – 10 µM) em corpos cavernosos de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 µM). Os resultados mostraram um deslocamento significativo da curva concentração-efeito ao sildenafil para a direita nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade em comparação com os ratos jovens, sendo este de aproximadamente quatro vezes (Figura 6, Tabela 2). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 µM; Figura 6A) ou SOD (75 U/mL; Figura 6B) restaurou significativamente ($P < 0.05$) a potência do sildenafil em corpos cavernosos de ratos de meia-idade (Tabela 2). Nos ratos jovens, a apocinina ou SOD também aumentou a potência do sildenafil; entretanto, em menor proporção comparado ao grupo meia-idade. A resposta máxima do sildenafil não foi alterada em nenhum dos grupos (Tabela 2).

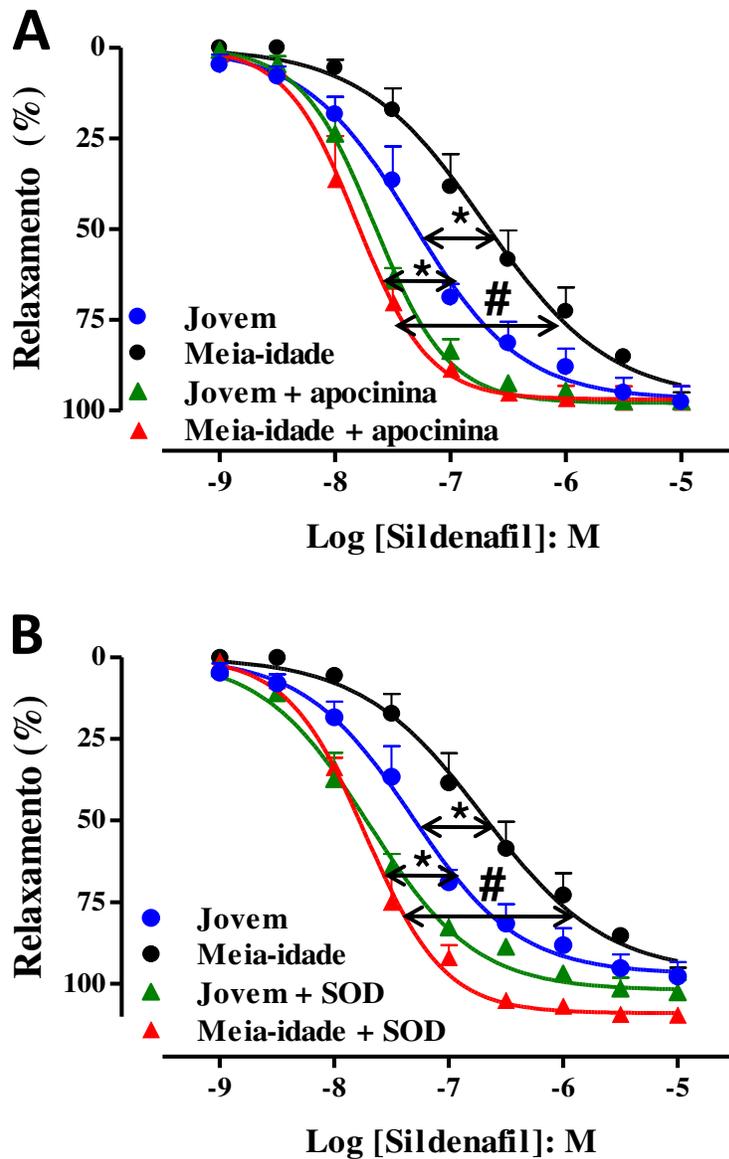


Figura 6. Curvas concentração-efeito ao sildenafil em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade na presença de apocinina (A) ou SOD (B). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-6 experimentos. * $P < 0.05$ comparado com o grupo jovem; # $P < 0.05$ comparado com o grupo meia-idade não tratado. As curvas para o sildenafil nos grupos jovem e meia-idade, na ausência de tratamento, foram repetidas nos painéis A e B para melhor visualização dos resultados.

3.1.7. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo 8-Br-GMPc

O relaxamento mediado pelo análogo do GMPc foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao 8-Br-GMPc (10 nM – 300 μ M) em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). Nem a potência, nem a resposta máxima do 8-Br-GMPc foi alterada nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade (Figura 7, Tabela 2).

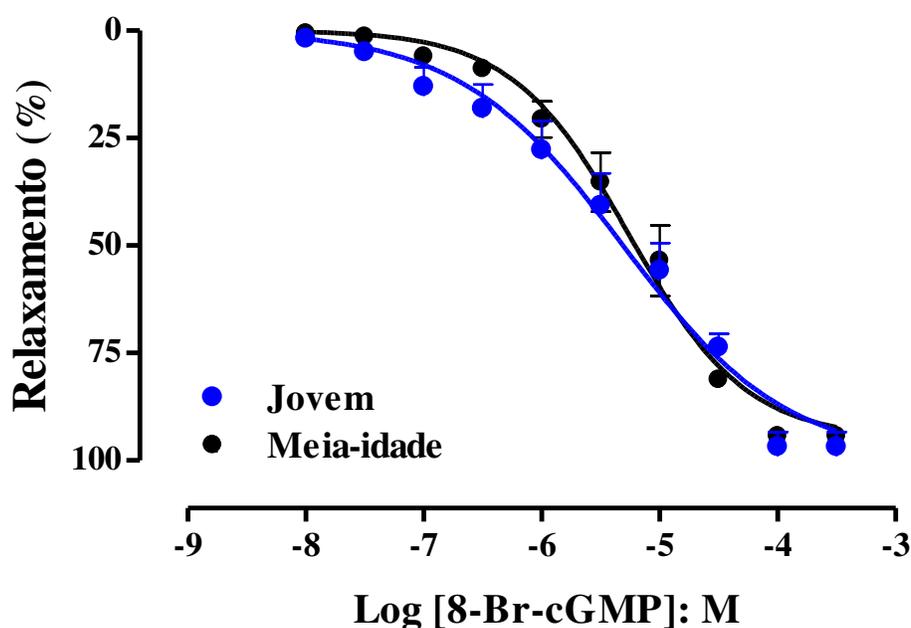


Figura 7. Curvas concentração-efeito ao 8-Br-GMPc em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-6 experimentos.

3.1.8. Efeito do tratamento crônico com apocinina sobre o relaxamento induzido pela ACh, SNP e EFS em corpo cavernoso

Os animais jovens e de meia-idade foram tratados com apocinina (85 mg/rato/dia) por quatro semanas. No grupo de meia-idade, a redução de potência (pEC_{50}) e da resposta máxima da ACh (Figura 8A) e SNP (Figura 8B) foram completamente restauradas pelo tratamento com apocinina ($P < 0.05$; Tabela 3). No grupo jovem, a potência e resposta máxima do SNP não foram alteradas pelo tratamento com apocinina. A resposta máxima da ACh também não foi modificada no ratos jovens tratados com apocinina, entretando, a potência da ACh foi aumentada. O tratamento com apocinina também restaurou significativamente ($P < 0.05$) os relaxamentos nitrérgicos do grupo meia-idade, sem interferir com o relaxamento do grupo jovem (Figura 9).

Tabela 3: Valores de potência (pEC_{50}) e resposta máxima (E_{max}) obtidos de curvas concentração-resposta em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, 4 semanas).

Grupos	Acetilcolina		Nitroprussiato de Sódio	
	pEC_{50}	E_{max}	pEC_{50}	E_{max}
Jovem	4.06 ± 0.10	69 ± 1	5.37 ± 0.08	104 ± 3
Jovem/Apo	$4.64 \pm 0.14 *$	66 ± 4	5.62 ± 0.07	100 ± 2
Meia-idade	$3.09 \pm 0.05 *$	$40 \pm 3*$	$4.37 \pm 0.05*$	$90 \pm 2*$
Meia-idade/Apo	$4.51 \pm 0.13\#$	$65 \pm 1\#$	$5.63 \pm 0.08\#$	$104 \pm 5\#$

Curvas concentração-resposta à acetilcolina (ACh, 10 nM – 10 mM) e nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM – 10 mM) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (Apo) na água de beber. Os dados representam média \pm E.P.M. para 5 – 6 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem; #P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado.

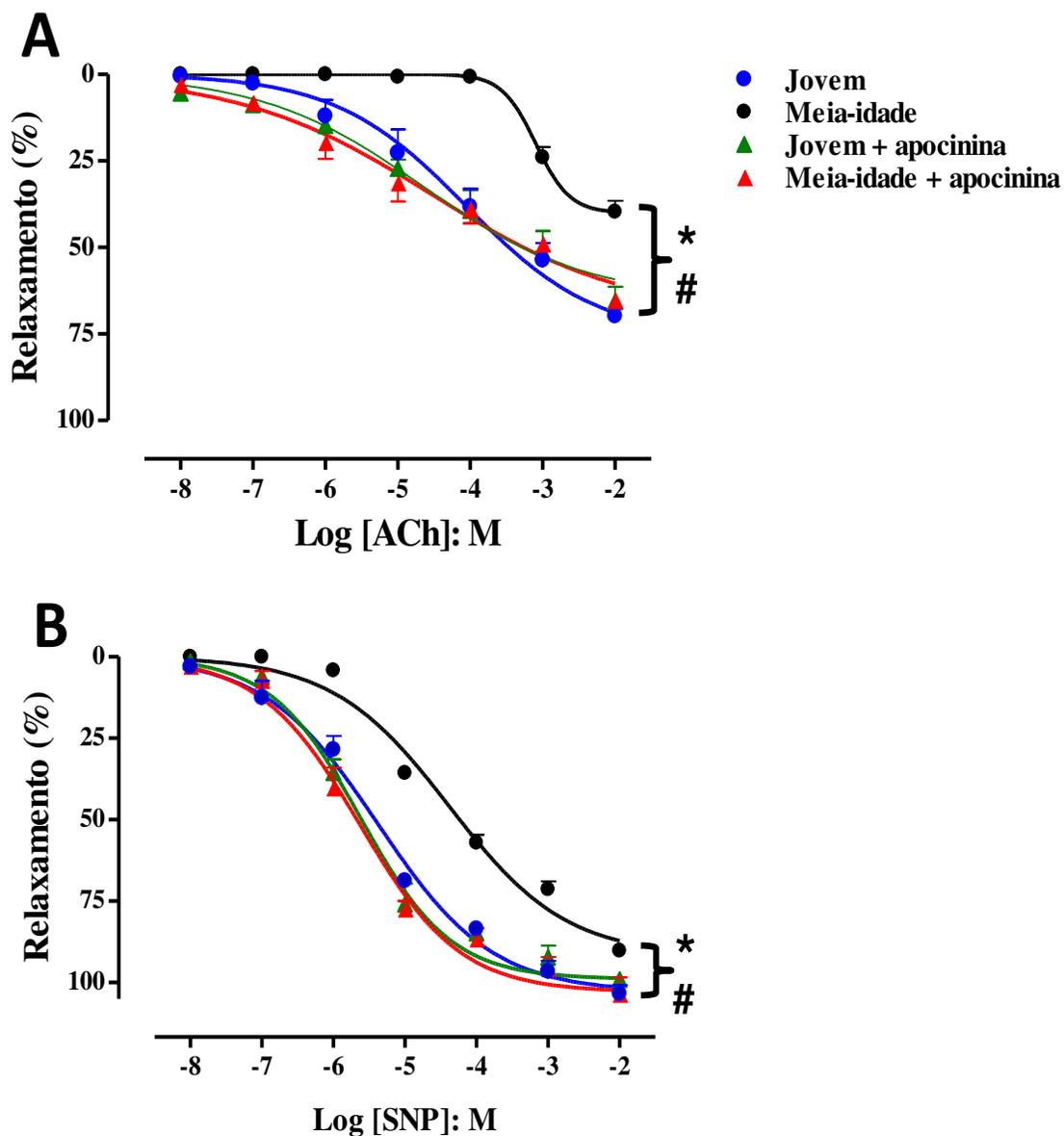


Figura 8. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh; **painel A**) e nitroprussiato de sódio (SNP; **painel B**) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, por quatro semanas). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-8 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem não tratado; # P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado.

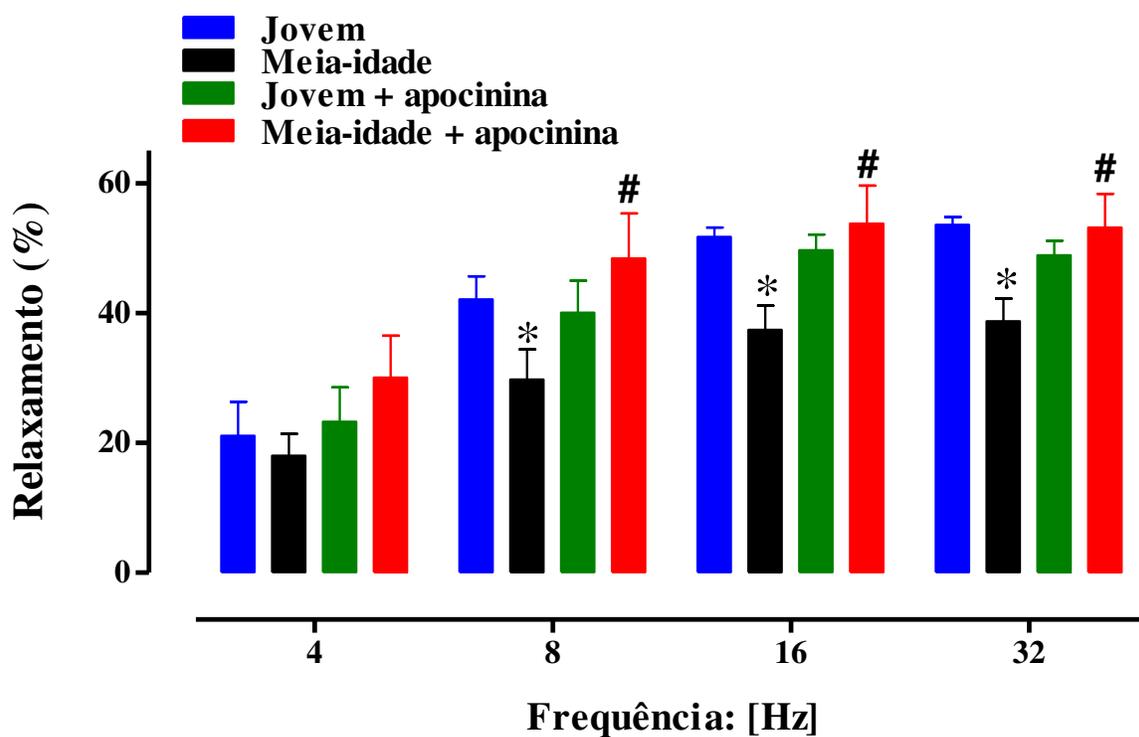


Figura 9. Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas (4 – 32 Hz) em animais jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, quatro semanas). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-9 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem não tratado; #P<0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado.

3.1.9. Determinação dos níveis de GMPc em corpo cavernoso

Os níveis basais de GMPc nos corpos cavernosos foram 64% menores no grupo meia-idade em comparação com o grupo jovem (Figura 10). A incubação dos tecidos com SNP (10 μ M) ou BAY 41-2272 (1 μ M) produziu aumentos significativos ($P < 0.05$) nos níveis de GMPc em ambos os grupos. Entretanto, as elevações de GMPc pelo SNP e BAY 41-2272 foram significativamente ($P < 0.05$) menores no grupo de meia-idade em comparação com o grupo jovem (Figura 10). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 μ M) ou SOD (75 U/mL) restaurou significativamente ($P < 0.05$) os níveis reduzidos de GMPc em corpos cavernosos de ratos de meia-idade estimulados com SNP (10 μ M) ou BAY 41-2272 (1 μ M), com nenhuma modificação no grupo jovem. O tratamento prévio com o inibidor de GCs, ODQ (100 μ M), aboliu as elevações de GMPc pelo SNP e BAY 41-2272 em ambos os grupos experimentais (Figura 10).

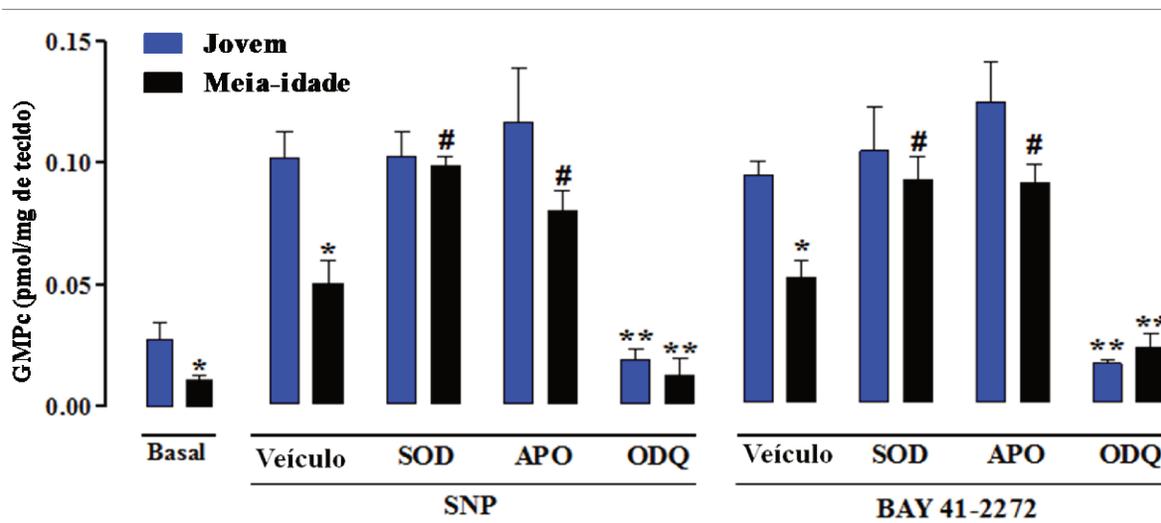


Figura 10. Níveis de GMPc em homogenatos de corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade. Os tecidos foram incubados com nitroprussiato de sódio (SNP; 10 μ M) ou BAY 41-2272 (1 μ M) na ausência e na presença de apocinina (Apo, 100 μ M), superóxido dismutase (SOD, 75 U/mL) ou ODQ (10 μ M). Os níveis de GMPc são expressos como média \pm erro padrão da média de 4 animais. *P < 0.05 comparado com o respectivo grupo jovem. #P < 0.05 comparado com o respectivo grupo meia-idade não tratado. **P < 0.05 comparado com o respectivo grupo veículo (ausência de ODQ).

3.1.10. Expressão protéica da nNOS, eNOS total, GCs (subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$) e da fosforilação da eNOS (Ser-1177 e Thr-495) em corpos cavernosos

A expressão protéica da nNOS e fosfo-eNOS (Ser-1177) nos corpos cavernosos foi 29% e 33% menor no grupo meia-idade em comparação com o grupo jovem, respectivamente (Figura 11). Nenhuma mudança foi observada na expressão protéica da eNOS total e fosfo-eNOS (Thr-495) em corpos cavernosos de ratos de meia-idade em relação ao grupo jovem (Figura 11).

A figura 12 ilustra a expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs. Podemos notar que expressão para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs foi 44% e 62% menor no grupo meia-idade em comparação com o grupo jovem, respectivamente.

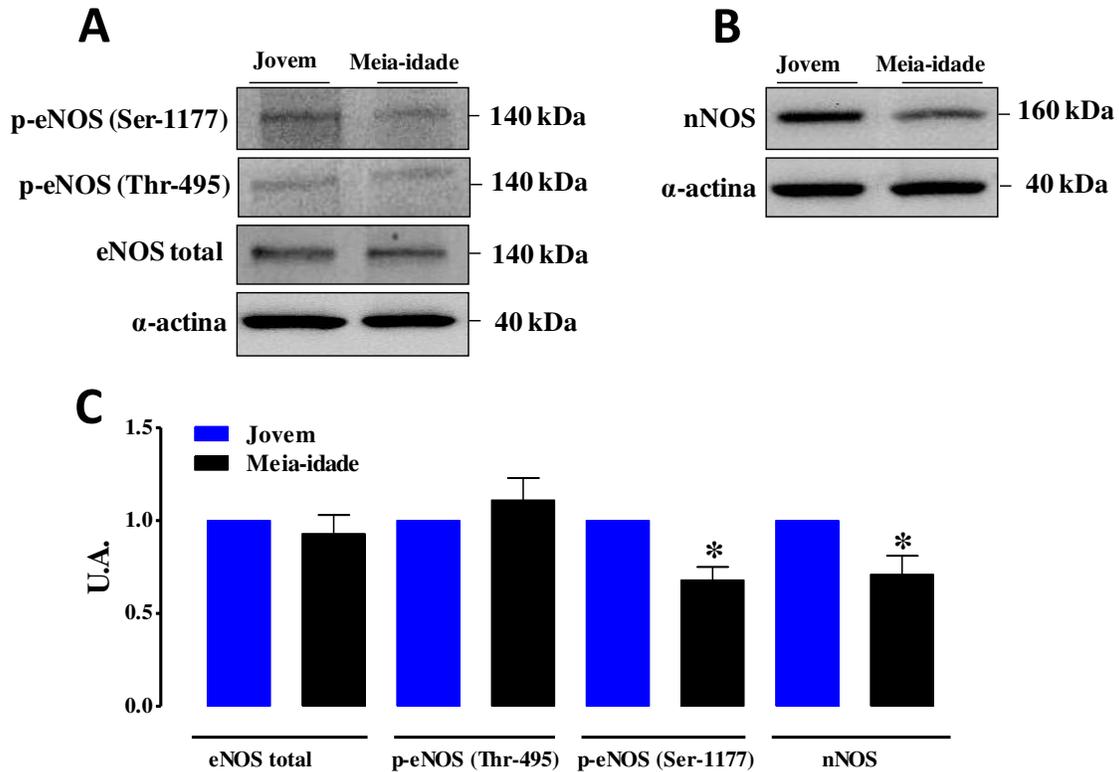


Figura 11. Expressão protéica da eNOS-total, p-eNOS (Ser-1177 e Thr-495) e nNOS em corpo cavernoso de ratos jovens e de meia-idade. *Western blotting* representativo para eNOS-total, p-eNOS (Ser-1177 e Thr-495) (**painel A**) e nNOS (**painel B**). Densitometria para eNOS-total, p-eNOS (Ser-1177 e Thr-495) e nNOS (**painel C**). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 4 experimentos. * $P < 0.05$ comparado com o grupo jovem. A eNOS total e nNOS foi normalizada em relação à α -actina. A p-eNOS (Ser-1177 e Thr-495) foi normalizada em relação à eNOS total.

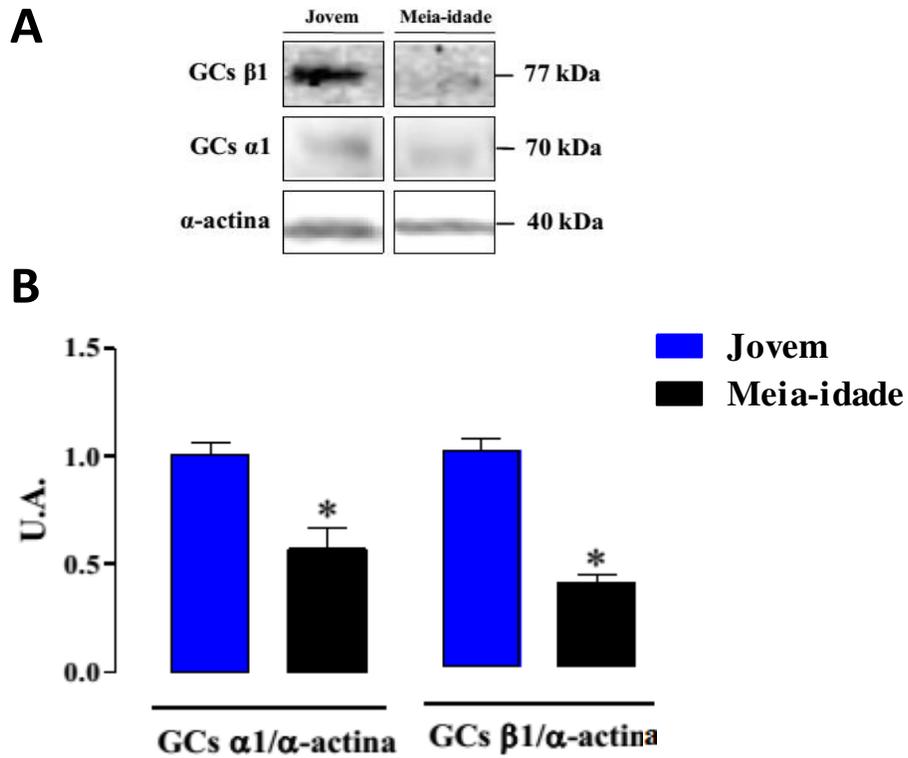


Figura 12. Expressão protéica das subunidades α 1 e β 1 da guanilato ciclase solúvel (GCs) em corpo cavernoso de ratos jovens e de meia-idade. **(A)** *Western blotting* representativo para as subunidades α 1 e β 1 da GCs. **(B)** Densitometria para as subunidades α 1 e β 1 da GCs. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 experimentos. * $P < 0.05$ comparado com o grupo jovem. As subunidades α 1 e β 1 da GCs foi normalizada em relação à α -actina.

3.1.11. Expressão gênica da $gp91^{phox}$ e SOD-1

A expressão do RNAm da $gp91^{phox}$ e superóxido dismutase-1 (SOD-1) foi avaliada em tecido cavernoso de ratos jovens e de meia-idade. Nos corpos cavernosos dos animais de meia-idade houve aumento significativo ($P < 0.05$) na expressão do RNAm da $gp91^{phox}$, de aproximadamente 64%, em comparação com o grupo jovem (Figura 13). A expressão do RNAm da SOD-1 foi similar entre os grupos (Figura 13).

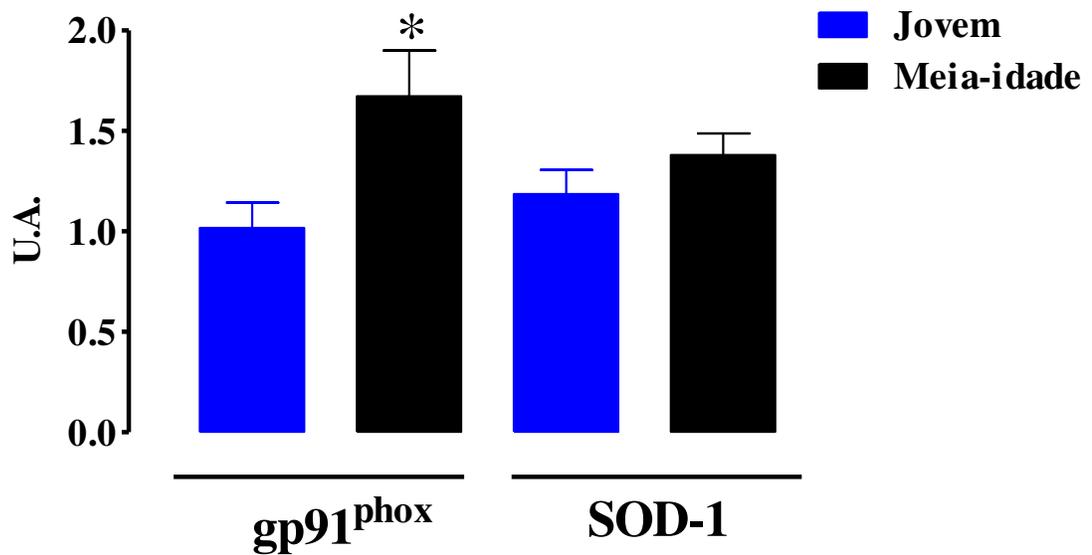


Figura 13. Expressão gênica do componente da NADPH oxidase ($gp91^{phox}$) e superóxido dismutase-1 (SOD-1) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 6 experimentos. * $P < 0.05$ comparado com o grupo jovem.

3.1.12. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em corpo cavernoso

Os níveis basais de ERO nos corpos cavernosos foram 64% maiores no grupo meia-idade em comparação com o grupo jovem (Figura 14). O tratamento com apocinina (85 mg/Kg/dia, 4 semanas) inibiu a formação de ERO no grupo meia-idade e jovem em 73% e 68%, respectivamente (Figura 14). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 μ M) ou SOD (75 U/mL) também inibiu a formação de ERO no grupo meia-idade e jovem (Figura 14).

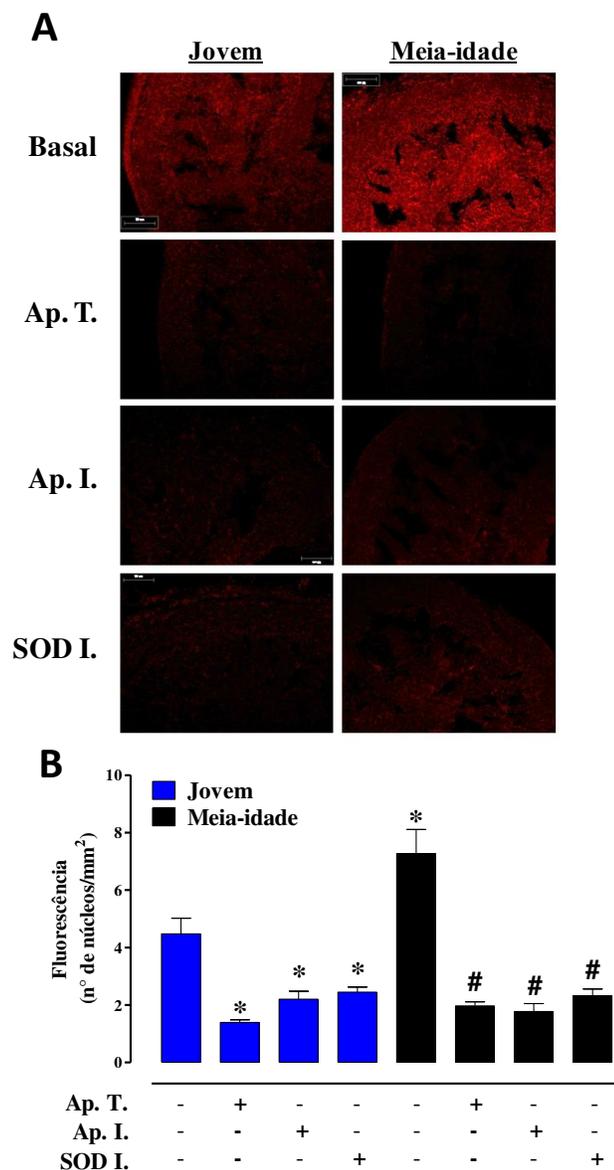


Figura 14. Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade pré-incubados com superóxido dismutase (SOD I; 75 U/mL), apocinina (Ap. I.; 100 μ M) ou tratados com apocinina (Ap. T.; 85 mg/rato/dia, por quatro semanas). **(A)** Imagens digitais de cortes histológicos e **(B)** análise quantitativa das ERO em corpos cavernosos. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem não tratado; #P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado.

3.1.13. Expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs em corpos cavernosos

A expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs nos corpos cavernosos foi 44% e 62% menor no grupo meia-idade em comparação com o grupo jovem, respectivamente (Figura 15). O tratamento com apocinina restaurou significativamente ($P < 0.05$) a expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade (Figura 15). Nos ratos jovens, a expressão protéica da subunidade $\beta 1$ da GCs não foi alterada pela tratamento com apocinina; entretanto, a expressão protéica da subunidade $\alpha 1$ da GCs foi significativamente maior pela apocinina ($P < 0.05$).

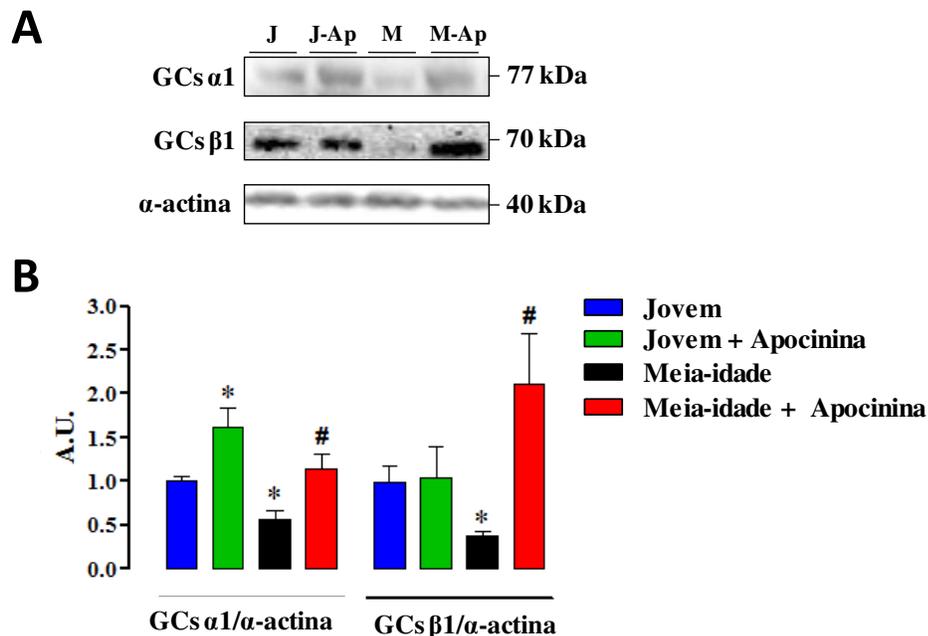


Figura 15. Expressão protéica das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs (guanilato ciclase solúvel) em corpo cavernoso de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, por quatro semanas). **(A)** *Western blotting* representativo para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs. **(B)** Densitometria para as subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 experimentos. As subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs foram normalizadas em relação à α -actina. * $P < 0.05$ comparado com o grupo jovem; # $P < 0.05$ comparado com o grupo meia-idade. Jovem (J); meia-idade (M); apocinina (Apo).

3.2. Contração do corpo cavernoso em rato de meia-idade

3.2.1. Contração de corpo cavernoso induzida por EFS

A EFS da preparação induziu contrações frequência-dependentes nos corpos cavernosos (4-32 Hz) que foram abolidas pela pré-incubação com guanetidina (30 μ M, N=10) ou com o antagonista do receptor α_1 adrenérgico, prazosin (1 μ M, N=3), confirmando que as respostas contráteis induzidas pelas EFS são mediadas pela liberação de noradrenalina. Nos ratos de meia-idade, a resposta neurogênica contrátil foi maior ($P < 0.05$) em comparação com os ratos jovens, em todas as frequências estudadas (Figura 16A, B). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 μ M; Figura 16A) ou SOD (75 U/mL; Figura 16B) não modificou de modo significativo a contração neurogênica em qualquer grupo.

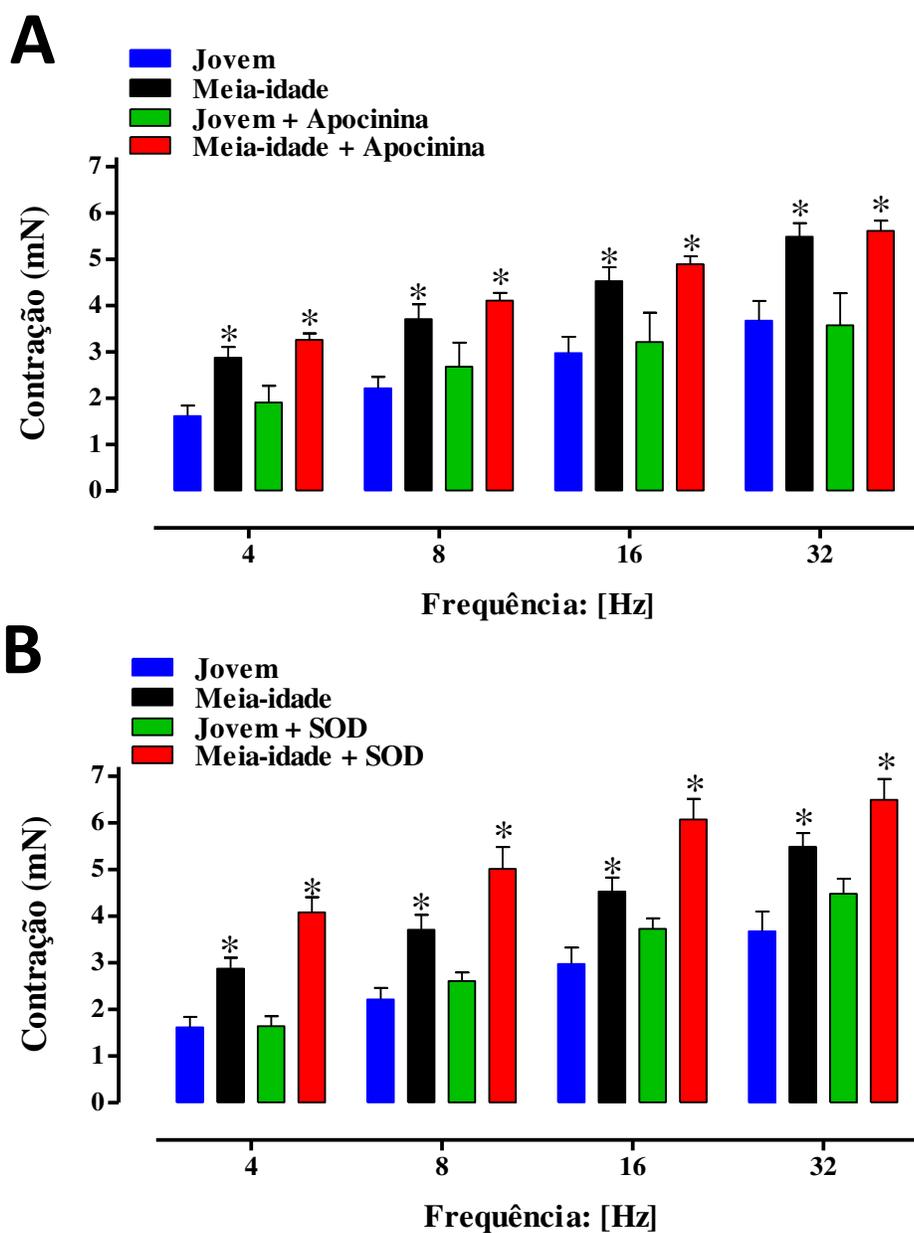


Figura 16. Contrações de corpos cavernosos induzidas por estimulações elétricas (EFS; 4 – 32 Hz) em animais jovens e de meia-idade na presença de apocinina (100 μ M, **A**) ou SOD (75 U/mL, **B**). As contrações foram calculadas em mN. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-10 experimentos. *P < 0.05 comparado com o respectivo grupo jovem. As curvas para a EFS nos grupos jovem e meia-idade, na ausência de tratamento, foram repetidas nos painéis A e B para melhor visualização dos resultados.

3.2.2. Contração de corpo cavernoso induzida pela fenilefrina

A contração à fenilefrina foi avaliada através da construção de curvas concentração-efeito a este agonista (10 nM – 100 µM) em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade. A resposta máxima à fenilefrina foi significativamente maior ($P < 0.05$) nos corpos cavernosos do grupo meia-idade (4.40 ± 0.33 mN) em comparação com o grupo jovem (3.48 ± 0.12 mN) (Figura 17). A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina (100 µM; Figura 17A) ou SOD (75 U/mL; Figura 17B) não modificou ($P < 0.05$) a contração induzida pela fenilefrina em nenhum grupo. Nenhuma alteração foi vista para os valores de potência (pEC_{50}) da fenilefrina entre os grupos experimentais (5.59 ± 0.03 , 5.82 ± 0.09 , 5.55 ± 0.06 , 5.57 ± 0.05 , 5.61 ± 0.07 e 5.64 ± 0.05 , para os grupos jovem, jovem + apocinina, jovem + SOD, meia-idade, meia-idade + apocinina e meia-idade + SOD, respectivamente).

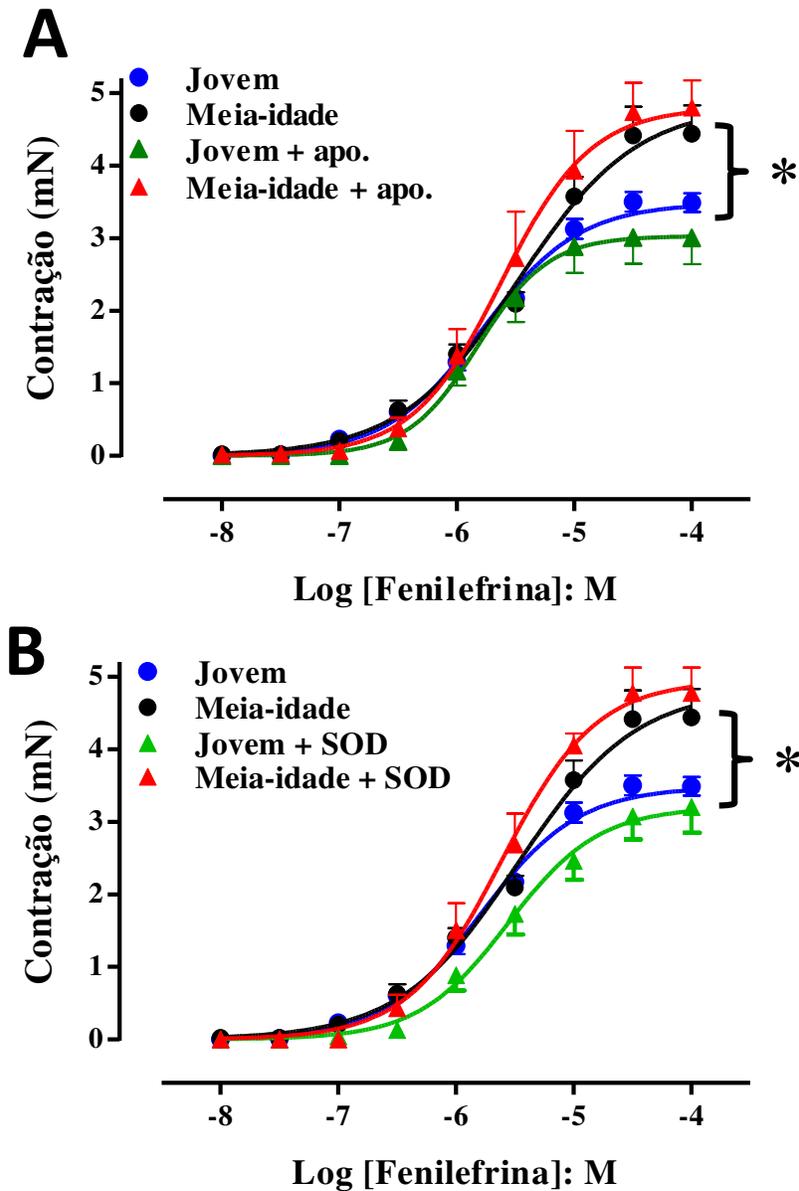


Figura 17. Curvas concentração-efeito à fenilefrina em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade na presença de apocinina (apo; 100 μ M, **A**) ou SOD (75 U/mL, **B**). As contrações foram calculadas em mN. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-10 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem. As curvas para a fenilefrina nos grupos jovem e meia-idade, na ausência de tratamento, foram repetidas nos painéis A e B para melhor visualização dos resultados.

3.2.3. Efeito do tratamento crônico com apocinina sobre a contração induzida pela EFS e fenilefrina em corpo cavernoso

A EFS da preparação induziu contrações frequência-dependentes nos corpos cavernosos (4-32 Hz). O tratamento com apocinina normalizou o aumento das ($P < 0.05$) respostas contráteis do grupo meia-idade, não alterando as respostas no grupo jovem (Figura 18A).

Em seguida, para avaliar apenas as respostas contráteis mediadas pela estimulação adrenérgica isoladamente, as preparações foram pré-tratadas com L-NAME (100 μ M) e atropina (1 μ M). Nesta condição, a resposta contrátil aumentou em cerca de 30-40% em ambos os grupos experimentais, mas, interessante, as contrações neurogênicas (4–32 Hz) permaneceram significativamente maiores nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade (Figura 18B). O aumento das contrações neurogênicas foi totalmente revertido pelo tratamento com apocinina nos ratos de meia-idade (Figura 18B). O tratamento com apocinina não alterou a contração do grupo jovem (Figura 18B).

O tratamento com apocinina também restaurou significativamente ($P < 0.05$) a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em corpos cavernosos de ratos de meia-idade (3.04 ± 0.20 mN), não alterando a resposta contrátil do grupo jovem (3.29 ± 0.39 mN) (Figura 19). Nenhuma alteração foi vista para os valores de potência (pEC_{50}) da fenilefrina em nenhum dos grupos experimentais (5.59 ± 0.03 , 5.74 ± 0.08 , 5.57 ± 0.05 e 5.52 ± 0.03 para os grupos jovem, jovem + apocinina, meia-idade e meia-idade + apocinina, respectivamente).

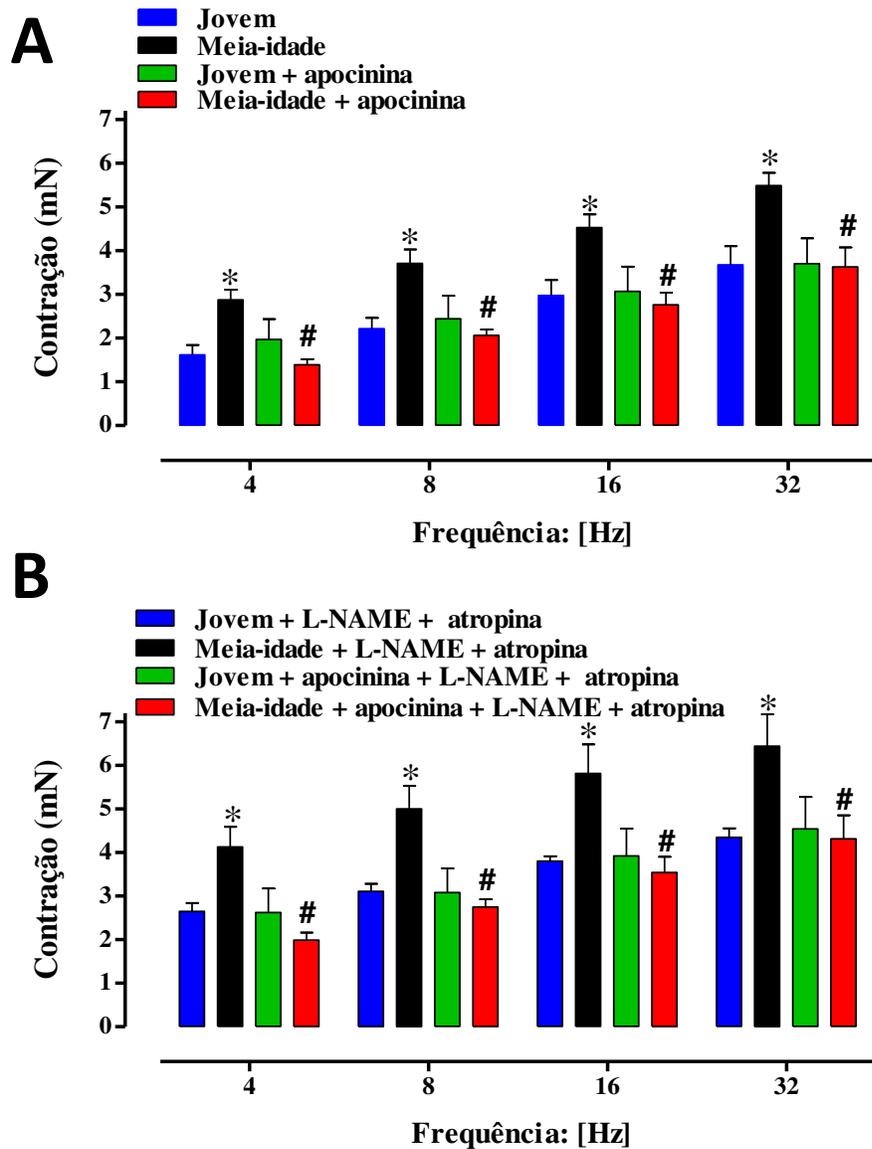


Figura 18. (A) Contrações neurogênicas de corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, por quatro semanas) induzidas pela estimulação elétrica (4 – 32 Hz). (B) Contrações induzidas pela estimulação elétrica (4 – 32 Hz) na presença de L-NAME (100 μ M) e atropina (1 μ M). As contrações foram calculadas em mN. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-10 experimentos. *P < 0.05 comparado com o grupo jovem; #P < 0.05 comparado com o grupo meia-idade não tratado.

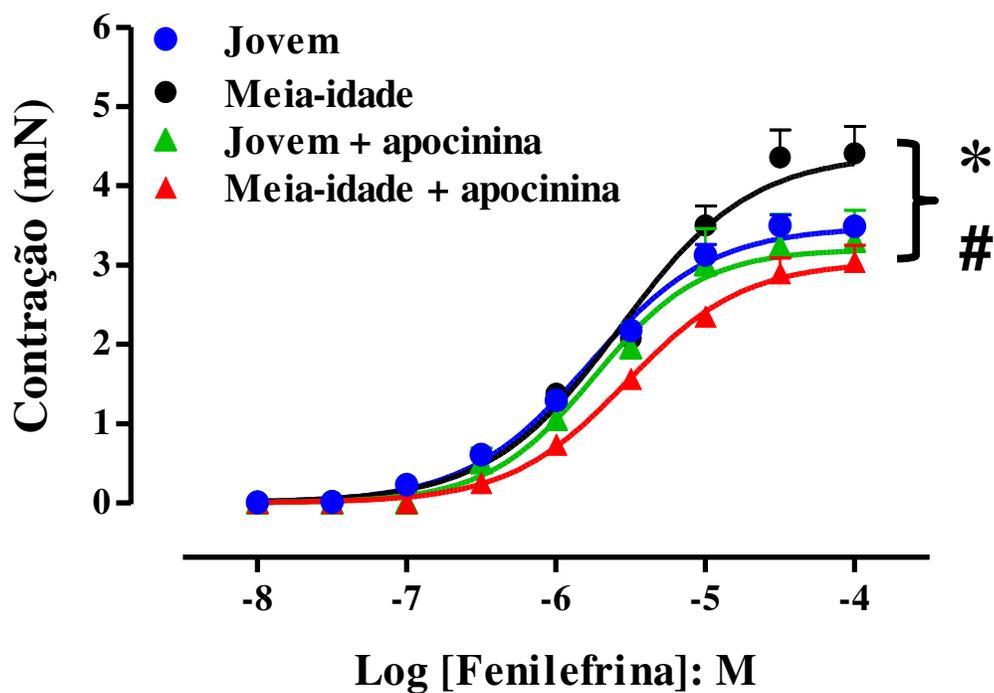


Figura 19. Curvas concentração-efeito à fenilefrina em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, por quatro semanas). As contrações foram calculadas em mN. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-10 experimentos. * $P < 0.05$ comparado com o grupo jovem; # $P < 0.05$ comparado com o grupo meia-idade.

3.2.4. Expressão protéica da tirosina hidroxilase em corpos cavernosos

A expressão protéica da tirosina hidroxilase nos corpos cavernosos foi aproximadamente duas vezes maior no grupo meia-idade em comparação com o grupo jovem (Figura 20). O tratamento com apocinina reverteu significativamente ($P < 0.05$) a expressão protéica da tirosina hidroxilase nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade. Nenhuma mudança foi observada na expressão protéica desta enzima nos corpos cavernosos de ratos jovens (Figura 20).

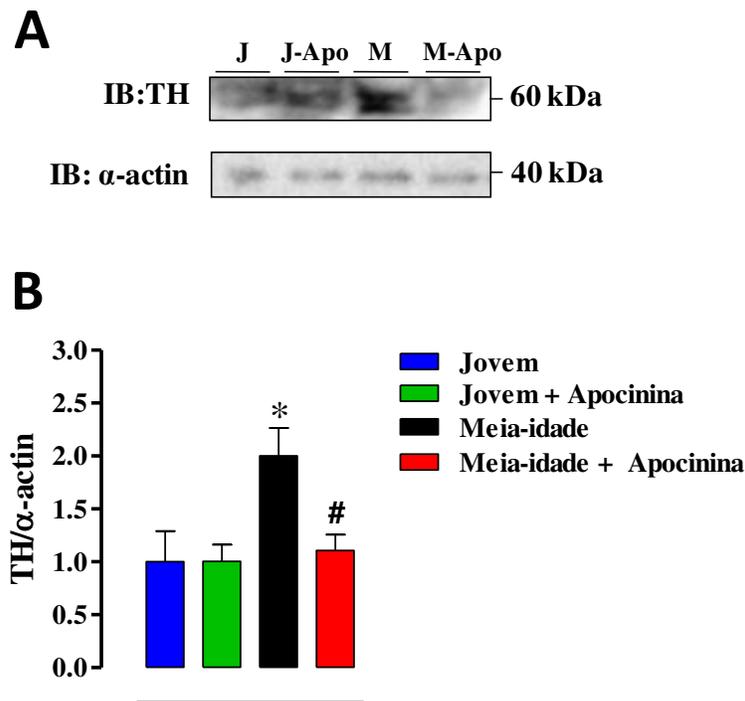


Figura 20. Expressão protéica da tirosina hidroxilase (TH) em corpo cavernoso de ratos jovens e de meia-idade tratados com apocinina (85 mg/rato/dia, por quatro semanas). (A) *Western blotting* representativo para tirosina hidroxilase. (B) Densitometria para tirosina hidroxilase. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 ratos. * $P < 0.05$ comparado com o grupo jovem; # $P < 0.05$ comparado com o grupo meia-idade não tratado. A TH foi normalizada em relação à α -actina. Jovem (J); meia-idade (M); apocinina (Apo).

4.DISSCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos têm mostrado que o envelhecimento é um fator de risco para a DE. A prevalência de DE aumenta significativamente com o envelhecimento, acometendo não somente idosos, mas também grande percentagem de homens de meia-idade (Feldman *et al.*, 1994; Teles *et al.*, 2008). Em modelos experimentais, apenas dois trabalhos procuraram avaliar as alterações precoces na função erétil em animais de meia-idade. Nestes estudos, a atividade da NOS e o relaxamento nitrérgico e dependente de endotélio foram menores em corpos cavernosos de ratos de meia-idade (Hosogai *et al.*, 2003; Gur *et al.*, 2005). O aumento da geração de ERO tem sido apontado como uma das principais causas das complicações vasculares decorrentes do envelhecimento, podendo contribuir para a DE na meia-idade. Portanto, neste estudo, procuramos entender a DE em sua fase inicial e o papel desempenhado pelo estresse oxidativo na função erétil de ratos de meia-idade. Na primeira etapa do trabalho, nossos resultados mostraram redução da pressão intracavernosa, do relaxamento nitrérgico, e do relaxamento dependente (ACh) e independente de endotélio (SNP) em ratos de meia-idade. Mostramos ainda que os níveis intracelulares de GMPc e das expressões protéicas da nNOS, fosfo-eNOS (Ser-1177) e GCs (subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$) estão menores nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade, ao mesmo tempo em que há aumento da expressão do RNAm da gp91^{phox} e da geração de ERO. Além disso, nossos resultados mostraram que a apocinina e a SOD previne a DE em ratos de meia-idade. No conjunto, o aumento da produção de ERO nos corpos cavernosos parece exercer papel crucial para DE em ratos de meia-idade.

O NO nitrérgico é considerado o principal mediador do relaxamento neurogênico do músculo liso peniano (Andersson *et al.*, 2011). Estudo prévio mostrou que o endotélio sinusoidal também libera NO em resposta à ACh (Sanes de Tejada *et al.*, 1988). Entretanto, a remoção do endotélio sinusoidal do tecido cavernoso não previne o relaxamento nitrérgico (Ignarro *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993), sendo aceito atualmente que o endotélio sinusoidal, através da liberação de NO, apenas auxilia a ereção peniana (Blando *et al.*, 1990; Knispel, 1992). É provável que o NO liberado das fibras nitrérgicas atua no início do processo de ereção peniana, enquanto o NO derivado do endotélio concomitantemente com o NO nitrérgico atua na sustentação do processo erétil (Hurt *et al.* 2002; 2012). Desta forma, decidimos investigar o relaxamento induzido pela ACh e pela estimulação das fibras nitrérgicas em corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade. Observamos que a resposta relaxante induzida pela ACh e EFS foi reduzida nos ratos de meia-idade, indicando um estado de disfunção endotelial e nitrérgica. De fato, a pressão intracavernosa foi significativamente menor nos ratos de meia-idade, confirmando um quadro de DE. Como a redução da expressão da NOS pode estar relacionada à menor resposta relaxante da musculatura cavernosa, decidimos avaliar os níveis protéicos das isoformas da NOS nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade. Notamos redução na expressão da nNOS e eNOS fosforilada no sítio regulatório Ser-1177 (ativo) nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade, ao passo que nenhuma mudança foi observada na expressão da eNOS total e eNOS fosforilada no sítio regulatório Thr-495 (inativo). A redução na expressão da nNOS e da eNOS fosforilada (Ser-1177) são consistentes com os nossos estudos funcionais, nos quais o relaxamento endotelial e nitrérgico foram menores nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade.

O processo de envelhecimento provoca um desequilíbrio entre a produção das ERO e a capacidade antioxidante do tecido (Frey *et al.*, 2009). A maior fonte intravascular de O_2^- em condições patológicas é a NADPH oxidase, um complexo enzimático composto por várias subunidades, onde a gp91^{phox} é subunidade catalítica responsável pela produção de O_2^- (Pendyala *et al.*, 2009; Bokoch *et al.*, 2009). Em contrapartida, as células possuem enzimas antioxidantes, destacando-se a SOD, que desempenha papel importante na regulação do estresse oxidativo, particularmente no sistema vascular, preservando a função do endotélio e do músculo liso, aumentando conseqüentemente a biodisponibilidade de NO (Darley-Usmar *et al.*, 1995; Kojda *et al.*, 1999). Estudos prévios mostraram que a DE em camundongos hipercolesterolêmicos, ratos diabéticos e ratos hipertensos é decorrente de aumento do estresse oxidativo no tecido erétil (Khan *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2008; Claudino *et al.*, 2010; Musicki *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2012). Portanto, em nosso estudo, procuramos avaliar o efeito da SOD e da apocinina (inibidor da NADPH oxidase) no relaxamento dos corpos cavernosos, assim como a expressão do RNAm da gp91^{phox} e SOD-1 no tecido cavernoso. A pré-incubação dos corpos cavernosos com SOD ou apocinina restaurou parcialmente a resposta relaxante mediada pela ACh, e restaurou completamente a resposta relaxante nitrérgica em corpos cavernosos de ratos de meia-idade. O tratamento com apocinina por quatro semanas também restaurou o relaxamento induzido pela ACh, SNP e EFS. A expressão do RNAm da gp91^{phox} foi maior nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade. Estes resultados indicam que a NADPH oxidase desempenha um papel importante no desenvolvimento da DE do rato de meia-idade, provavelmente, por produzir O_2^- em excesso, que reagiria rapidamente com o NO, reduzindo a biodisponibilidade de NO, e portanto o relaxamento dos corpos cavernosos nesses animais. De fato, os níveis de

ERO foram maiores nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade, sendo estes revertidos pelo tratamento crônico com apocinina, assim como pela pré-incubação com SOD ou apocinina. É interessante que, apesar de a SOD normalizar o relaxamento nos animais de meia-idade, nenhuma mudança foi observada na expressão da SOD-1. A SOD atua convertendo o O_2^- para H_2O_2 , que posteriormente é convertida pela catalase e/ou glutatona em água (Takimoto & Kass 2007; Frey *et al.*, 2009). É provável que devido o aumento da geração de ERO, o sistema antioxidante não esteja conseguindo suprimir de forma eficiente os altos níveis de ERO.

O NO pode ser exogenamente fornecido para os tecidos e células por vários compostos denominados doadores de NO. O composto inorgânico SNP é um agente que libera NO no sistema biológico por mecanismos não enzimáticos e enzimáticos, e produz relaxamento independente de endotélio, mas dependente de GMPC (Kowaluk *et al.*, 1992; Feelisch *et al.*, 1998; Bonaventura *et al.*, 2008). Estudo anterior relatou também que o relaxamento induzido pelo SNP é potencializado pelo NO oriundo do endotélio em aorta de rato (Bonaventura *et al.*, 2008). Em nosso estudo, o relaxamento induzido pelo SNP foi significativamente menor nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade. A pré-incubação dos corpos cavernosos com apocinina ou SOD restaurou completamente o relaxamento induzido pelo SNP no grupo meia-idade. Estes resultados são consistentes com a redução dos níveis de GMPC em resposta ao SNP e restauração dos mesmos pela SOD ou apocinina nos corpos cavernosos desses animais. É provável que o aumento da produção de O_2^- esteja inativando o NO (liberado do SNP no interior da célula) antes que este atinja a GCs na musculatura lisa cavernosa de ratos de meia-idade. De acordo com nossos resultados, estudos anteriores em corpos cavernosos e artéria mesentérica relataram que o estresse

oxidativo reduz o relaxamento induzido pelo SNP, que é restaurado pela SOD ou apocinina (Khan *et al.*, 2001; Jiménez-Altayó *et al.*, 2006).

O estimulador da GCs independente de NO, BAY 41-2272 (Stasch *et al.*, 2001), é um potente agente capaz de induzir relaxamento em diferentes tipos de musculatura lisa (Toque *et al.*, 2009, 2008; Priviero *et al.*, 2009; Báu *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2012), incluindo corpos cavernosos (Baracat *et al.*, 2003; Bischoff *et al.*, 2003; Kalsi *et al.*, 2003). As ações biológicas do BAY 41-2272 são principalmente dependentes da presença do grupamento prostético heme da GCs em sua forma reduzida (Evgenov *et al.*, 2006). Em nosso estudo, o relaxamento induzido pelo BAY 41-2272 foi significativamente reduzido nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade, sendo completamente restaurado pela pré-incubação com SOD ou apocinina. De acordo com estes resultados, os níveis de GMPc também foram menores nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade estimulados com BAY 41-2272, e restaurados pela pré-incubação com apocinina ou SOD. Estudos anteriores em corpos cavernosos e artérias mesentéricas relataram que na ausência do NO há um deslocamento para direita na curva concentração-efeito ao BAY 41-2272, revelando que este composto atua sinergicamente com o NO endógeno para promover seu efeito relaxante (Priviero *et al.*, 2009; Baracat *et al.*, 2003). Portanto, é provável que a redução do relaxamento induzido pela BAY 41-2272 no tecido erétil de ratos de meia-idade seja devido à remoção do NO endógeno. Isto é consistente com nossos dados mostrando que o análogo permeável do GMPc, o 8-Br-GMPc, produz relaxamento de mesma magnitude nos corpos cavernosos dos ratos jovens e de meia-idade.

A fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5) é a principal enzima responsável pelo metabolismo do GMPc nos corpos cavernosos. O inibidor seletivo de PDE5, sildenafil,

aumenta os níveis intracelulares de GMPc, potencializando o relaxamento dependente de NO em ratos (Carson *et al.*, 2005; Boswell-Smith *et al.*, 2006). Em nosso estudo, o sildenafil produziu relaxamento dependente da concentração, sendo que a curva concentração-resposta a este inibidor mostrou-se deslocada para a direita nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade, que foi restaurada pela apocinina ou SOD. Em corpos cavernosos de humanos e aorta de ratos, o L-NAME promoveu deslocamento para a direita da curva concentração-efeito aos inibidores de PDE5, sugerindo que, além de inibir a PDE5, estas drogas necessitam do NO endógeno para promover acúmulo de GMPc (Kalsi *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2006; Toque *et al.*, 2009). Assim, a redução da biodisponibilidade de NO pelo O_2^- parece também repercutir negativamente no relaxamento de corpo cavernoso em resposta aos inibidores de PDE5.

A GCs é uma proteína citosólica heterodimérica constituída por duas subunidades, denominadas α e β , sendo necessária a expressão das duas subunidades para a atividade catalítica da GCs. Em humanos a GCs apresenta quatro subunidades, denominadas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$, sendo o heterodímero $\alpha 1/\beta 1$ o mais expresso. Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal, uma região de dimerização e um domínio catalítico C-terminal, o qual é responsável pela conversão de GTP em GMPc (Lucas *et al.*, 2000; Evgenov *et al.*, 2006;). Estudos anteriores relataram que em doenças cardiovasculares, o estresse oxidativo parece afetar a expressão da GCs (Stasch *et al.*, 2006; Evgenov *et al.*, 2006, Gerassimou *et al.*, 2007). Em ratos com 16 meses de idade, estudo prévio mostrou que a expressão protéica da GCs está reduzida em aorta (Kloss *et al.*, 2000). No presente estudo, a expressão das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da GCs foi menor nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade em comparação com os ratos jovens, a qual foi restaurado pelo

tratamento com apocinina. Assim, é provável que a redução da expressão da GCs prejudique a produção fisiológica de GMPc nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade, favorecendo o estado contrátil do músculo liso vascular.

Na segunda etapa do trabalho, analisamos o papel do estresse oxidativo sobre os mecanismos contráteis do corpo cavernoso de rato de meia-idade. Nossos resultados mostraram aumento da resposta contrátil mediada pelos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, concomitantemente com aumento da expressão protéica da tirosina hidroxilase, sendo os mesmos normalizados pelo tratamento crônico com apocinina. Isto sugere que o aumento do estresse oxidativo desempenha papel crucial na maquinaria contrátil de corpos cavernosos na meia-idade.

Durante o estado flácido, a atividade simpática é predominante; as arteríolas e os sinusóides estão contraídos, permitindo pequena quantidade de influxo arterial. As catecolaminas causam contração do tipo concentração-dependente em corpos cavernosos, artérias e veias penianas (Andersson, 2011). O receptor $\alpha 1$ -adrenérgico é funcionalmente predominante em corpo cavernoso, e a fenilefrina exerce potente ação constritora neste tecido (Imagawa *et al.*, 1989; Christ *et al.*, 1990). Além disso, a injeção intracavernosa de antagonista α -adrenérgico induz tumescência e ereção, enquanto que agonista α -adrenérgico causam detumescência (Blum *et al.*, 1985). Em animais hipertensos, obesos e diabéticos, a DE tem sido associada com aumento da inervação e estimulação simpática no tecido erétil (Morrison *et al.*, 2007; Carneiro *et al.*, 2008). Por isso, em nosso estudo, procuramos avaliar inicialmente a contração de corpos cavernosos induzida pela estimulação elétrica. As contrações neurogênicas de corpos cavernosos foram significativamente maiores nos ratos de meia-idade em comparação com o grupo jovem.

Em experimentos separados, os tecidos foram previamente tratados com L-NAME e atropina com o objetivo de se avaliar as respostas contráteis mediadas pela estimulação simpática sem interferência do NO. Nessas condições, mostramos que a estimulação elétrica continuou produzindo contrações neurogênicas maiores nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade. A noradrenalina é sintetizada a partir do aminoácido precursor L-tirosina. A enzima tirosina hidroxilase catalisa a conversão da L-tirosina em L-diidroxifenilalanina (DOPA), sendo esta primeira etapa fundamental para a síntese de catecolaminas. Posteriormente, a L-DOPA é convertida em dopamina pela DOPA descarboxilase, que por sua vez é convertida em noradrenalina pela dopamina β -hidroxilase (Nakashima *et al.*, 2009). O aumento da expressão da tirosina hidroxilase está associado à hiperatividade simpática (Morrison *et al.*, 2007; Parrish *et al.*, 2008; Burgi *et al.*, 2011). Portanto, em nosso estudo, avaliamos a expressão protéica para tirosina hidroxilase nos corpos cavernosos de ratos jovens e de meia-idade. De fato, a expressão protéica para esta enzima foi maior no grupo meia-idade em comparação com o grupo jovem. Este aumento para a tirosina hidroxilase é consistente com o nosso estudo funcional, onde as contrações noradrenérgicas foram maiores nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade. Assim, é também possível que a liberação de noradrenalina pelos terminais simpáticos seja maior em corpos cavernosos dos ratos de meia-idade, que poderá ser confirmado futuramente quantificando-se a liberação de [3 H]-noradrenalina do tecido erétil.

O NO também modula a neurotransmissão simpática em diferentes leitos vasculares (Schwarz *et al.*, 1995; Macarthur *et al.*, 2008), incluindo corpos cavernosos (Cellek *et al.*, 1997; Jeremy *et al.*, 2007). Estudo prévio realizado em artéria mesentérica relatou que o aumento do estresse oxidativo está associado à hiperatividade simpática (Macarthur *et al.*,

2008). Nossos resultados mostraram aumento da produção de ERO em corpos cavernosos de ratos de meia-idade, sugerindo que a redução da biodisponibilidade de NO pelo aumento do estresse oxidativo pode contribuir para hiperatividade simpática em corpos cavernosos de ratos de meia-idade. Portanto, em nosso estudo, os ratos jovens e de meia-idade foram tratados com apocinina por quatro semanas. Este tratamento reduziu os níveis de ERO, restaurou o aumento das contrações noradrenérgica e da expressão protéica da tirosina hidroxilase em corpos cavernosos de ratos de meia-idade. Estudo anterior com artéria mesentérica de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) relatou que a redução da biodisponibilidade de NO associada ao estresse oxidativo contribui para a hiperatividade simpática, a qual é restaurada pelo antioxidante, N-acetilcisteína (Macarthur *et al.*, 2008). Outro estudo mostrou que a suplementação com L-arginina corrige a hiperatividade noradrenérgica cardíaca em SHR, provavelmente, por ativar a via NOS-GMPc nos terminais simpáticos e reduzir a expressão protéica da tirosina hidroxilase (Lee *et al.*, 2009). Portanto, é provável que a redução crônica na biodisponibilidade de NO associada ao aumento da expressão protéica da tirosina hidroxilase levam ao aumento da liberação de noradrenalina em corpos cavernosos de ratos de meia-idade, resultando em contrações α 1-adrenérgicas aumentadas. Em corpos cavernosos de ratos jovens, apesar do tratamento com apocinina ter reduzido os níveis de ERO, nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas contráteis por este tratamento. Este resultado está de acordo com estudos anteriores mostrando que a função erétil de ratos e camundongos em condições fisiológicas não é modificada pelo tratamento crônico com apocinina (Jin *et al.*, 2008; Musicki *et al.*, 2010). Estudo anterior relatou que a contração de corpos cavernosos induzida pela fenilefrina aumenta progressivamente com o envelhecimento (Christ *et al.*, 1990). Em nosso

estudo, a resposta máxima para fenilefrina foi maior nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade, que também foi restaurada pelo tratamento com apocinina. Portanto, nossos dados sugerem que a normalização dos níveis de ERO pela apocinina contrabalança a contração mediada pelos receptores α 1-adrenérgicos. Além disso, é possível que a expressão do receptor α 1-adrenérgico esteja maior nos corpos cavernosos de ratos de meia-idade. Isto poderá ser confirmado futuramente por estudos de *binding* ou por expressão protéica/gênica deste receptor. Coletivamente, estes dados mostram que o aumento das respostas contráteis induzidas pela fenilefrina e EFS em corpos cavernosos de ratos de meia-idade pode desfavorecer a tumescência peniana.

5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- A pressão intracavernosa (*in vivo*) foi significativamente menor nos ratos de meia-idade;
- Os relaxamentos produzidos pela ACh, SNP, BAY 41-2272, sildenafil e estimulação elétrica foram significativamente menores nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade, ao passo que o relaxamento produzido pelo 8-Br-GMPc não foi modificado no grupo meia-idade;
- Os níveis de GMPc nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade foram significativamente menores em comparação com os ratos jovens;
- Houve redução da expressão protéica da nNOS, eNOS fosforilada (Ser-1177) e GCs (subunidades α_1 e β_1) no grupo meia-idade;
- Houve aumento da expressão do RNAm da gp91^{phox} e da geração de ERO no grupo meia-idade;
- A pré-incubação com apocinina ou SOD reverteu o aumento da geração de ERO e as alterações das respostas relaxantes nos corpos cavernosos dos ratos de meia-idade;
- A contração induzida pela fenilefrina e EFS foi maior no grupo meia-idade, a qual não foi modificada pela pré-incubação com apocinina ou SOD;
- O tratamento crônico com apocinina normalizou o relaxamento nitrérgico, o relaxamento dependente (ACh) e independente (SNP) de endotélio, a contração mediada pelos receptores α_1 -adrenérgicos, assim como a expressão protéica da tirosina hidroxilase e GCs (subunidades α_1 e β_1) no grupo meia-idade;
- Concluimos que a DE em ratos de meia-idade é decorrente da redução da biodisponibilidade de NO e de o aumento do estresse oxidativo. A diminuição do estresse oxidativo no tecido erétil por terapias antioxidantes pode ser uma boa estratégia farmacológica para o tratamento da DE em estágios iniciais de impotência sexual masculina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersson KE. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. **Pharmacol Rev.** 2011; 63: 811-59.
2. Angulo J, Cuevas P, Fernández A, Gabancho S, Allona A, Martín-Morales A, Moncada I, Sáenz De Tejada I. Activation and potentiation of the NO/cGMP pathway by NG hydroxyl-L-arginine in rabbit corpus cavernosum under normoxic and hypoxic conditions and ageing. **Br J Pharmacol.** 2003; 138: 63-70.
3. Baracat JS, Teixeira CE, Okuyama CE, Priviero FB, Faro R, Antunes E, De Nucci G. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. **Eur J Pharmacol.** 2003; 77: 163-9.
4. Báú FR, Mónica FZ, Priviero FB, Baldissera L Jr, de Nucci G, Antunes E. Evaluation of the relaxant effect of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in isolated detrusor smooth muscle. **Eur J Pharmacol.** 2010; 637: 171-7.
5. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **J Physiol.** 2008; 586: 5047-5061.
6. Bischoff E, Schramm M, Straub A, Feurer A, Stasch JP. BAY 41-2272: a stimulator of soluble guanylyl cyclase induces nitric oxide-dependent penile erection in vivo. **Urology** 2003; 61:464-7.
7. Bivalacqua TJ, Usta MF, Kendirci M, Pradhan L, Alvarez X, Champion HC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Superoxide anion production in the rat penis impairs erectile function in diabetes: influence of in vivo extracellular superoxide dismutase gene therapy. **J Sex Med.** 2005; 2: 187-197.
8. Blum MD, Bahnson RR, Porter TN, Carter MF. Effect of local alpha-adrenergic blockade on human penile erection. **J Urol.** 1985; 134: 479-81.
9. Böhm M, Baumhäkel M, Teo K, Sleight P, Probstfield J, Gao P, Mann JF, Diaz R, Dagenais GR, Jennings GL, Liu L, Jansky P, Yusuf S. Erectile dysfunction predicts cardiovascular events in high-risk patients receiving telmisartan, ramipril, or both: The ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial/Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE iNtolerant subjects with cardiovascular Disease (ONTARGET/TRANSCEND) Trials. **Circulation.** 2010; 121: 1439-46.
10. Bokoch GM, Diebold B, Kim JS, Gianni D. Emerging evidence for the importance of phosphorylation in the regulation of NADPH oxidases. **Antioxid Redox Signal.** 2009;11(10):2429-41.

11. Bonaventura D, Lunardi CN, Rodrigues GJ, Neto MA, Bendhack LM. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide** 2008; 18: 287-95.
12. Bortolotti A, Parazzini F, Colli E, LAndoni M. The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. **Int J Androl.** 1997; 20: 323-334.
13. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. **Br J Pharmacol.** 2006;147: S252-7.
14. Brennan AM, Suh SW, Won SJ, Narasimhan P, Kauppinen TM, Lee H, Edling Y, Chan PH, Swanson RA. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. **Nat Neurosci.** 2009; 12: 857-63.
15. Burgi K, Cavalleri MT, Alves AS, Britto LR, Antunes VR, Michelini LC. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2011; 300: R264-71.
16. Burnett AL. Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. **Int J Impot Res.** 2004; 16: S15-9.
17. Bush PA, Gonzalez NE, Ignarro LJ. Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1992; 186: 308-314.
18. Carneiro FS, Giachini FR, Lima VV, Carneiro ZN, Nunes KP, Ergul A, Leite R, Tostes RC, Webb RC. DOCA-salt treatment enhances responses to endothelin-1 in murine corpus cavernosum. **Can J Physiol Pharmacol.** 2008; 86: 320-8.
19. Carson CC, Lue TF. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. **BJU Int.** 2005; 96: 257-80.
20. Cellek S, Moncada S. Nitrergic control of peripheral sympathetic responses in the human corpus cavernosum: a comparison with other species. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1997; 94: 8226-31.
21. Christ GJ, Kim DC, Taub HC, Gondre CM, Melman A. Characterization of nitroglycerine induced relaxation in human corpus cavernosum smooth muscle: implications to erectile physiology and dysfunction. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 1995; 73: 1714-1726.
22. Christ GJ, Maayani S, Valcic M, Melman A. Pharmacological studies of human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions and alterations in alpha-

- adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. **Br J Pharmacol.** 1990; 101: 375-81.
23. Claudino MA, Franco-Penteado CF, Priviero FB, Camargo EA, Teixeira SA, Muscará MN, De Nucci G, Zanesco A, Antunes E. Upregulation of gp91phox subunit of NAD(P)H oxidase contributes to erectile dysfunction caused by long-term nitric oxide inhibition in rats: reversion by regular physical training. **Urology.** 2010; 75: 961-7.
 24. Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). **Neurochem. Int.** 2004; 45: 859-863.
 25. Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG, Kaminski P, Wolin MS, Koller A, Kaley G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. **Circ Res.** 2002; 90: 1159-1166.
 26. da Silva FH, Claudino MA, Báú FR, Rojas-Moscó JA, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Vas deferens smooth muscle responses to the nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272. **Eur J Pharmacol.** 2012; 688: 49-55.
 27. Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Lett.** 1995; 369: 131-5.
 28. Dayal S, Wilson KM, Motto DG, Miller FJ Jr, Chauhan AK, Lentz SR. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis. **Circulation.** 2013 26; 127(12):1308-16.
 29. DE Carvalho, JA, Garcia RA. [The aging process in the Brazilian population: a demographic approach]. **Cad Saude Publica.** 2003; 19: 725-733.
 30. De groat W & Booth A. Neural control of penile erection. **London Hawoord.** 1993; 465-513.
 31. Dean RC & Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urol Clin North Am.** 2005; 4: 379-95.
 32. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, Seals DR. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. **Circ Res.** 2007; 100 (11): 1659-1666.
 33. El Assar M, Angulo J, Rodríguez-Mañas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. **Free Radic Biol Med.** 2013.

34. El-Sakka AI, Lue TF. Physiology of penile erection. **Scientific World Journal**. 2004; 1:128-34.
35. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. **Nat Rev Drug Discov**. 2006; 5:755-68.
36. Feelisch M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 1998; 358: 113-22.
37. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, Mckinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. **J Urol**. 1994; 151: 54-61.
38. Ferrer JE, Velez JD, Herrera AM. Age-related morphological changes in smooth muscle and collagen content in human corpus cavernosum. **J Sex Med**. 2010; 7: 2723-8.
39. Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik A. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. **Antioxid Redox Signal**. 2009; 11: 791-810.
40. Gerassimou C, Kotanidou A, Zhou Z, Simoes DC, Roussos C, Papapetropoulos A. Regulation of the expression of soluble guanylyl cyclase by reactive oxygen species. **Br J Pharmacol**. 2007;150: 1084-91.
41. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **J Clin Invest**. 2005; 115: 500-508.
42. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil study group. **N Engl J Méd**. 1998; 338: 1397-1404.
43. Gratzke C, Angulo J, Chitaley K, Dai YT, Kim NN, Paick JS, Simonsen U, Uckert S, Wespes E, Andersson KE, Lue TF, Stief CG. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med**. 2010; 7(1): 445-475.
44. Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. RhoA/Rho-kinase as a therapeutic target for the male urogenital tract. **J Sex Med**. 2011; 8(3): 675-87.
45. Gur S, Karahan ST, Ozturk B, Badilli M. Effect of ascorbic acid treatment on endothelium-dependent and neurogenic relaxation of corpus cavernosum from middle-aged non-insulin dependent diabetic rats. **Int J Urol**. 12: 821-828.
46. Halata Z, Nunger BL. The neuroanatomical basis for the protopathic sensibility of the human glans penis. **Brain Res.**, 1986; (2): 205-30.

47. Hayashi T, Juliet PA, Kano-Hayashi H, Tsunekawa T, Dingqunfang D, Sumi D, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Iguchi A. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. **Diabetes Obes Metab.** 2005; 7: 334-343.
48. Hayashida H, Okamura T, Tomoyoshi T, Toda N. Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum. **J Urol.** 1996; 155: 1122-1127.
49. Hedlund P, Alm P, Andersson KE. NO synthase in cholinergic nerves and NO induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. **Br J Pharmacol.** 1999; 127: 349-60.
50. Hellstrom WJ, Monga M, Wang R, Domer FR, Kadowitz PJ, Roberts JA. Penile erection in the primate: induction with nitric oxide donors. **J Urol.** 1994; 151: 1723-1727.
51. Helmy MM, Senbel AM. Evaluation of vitamin E in the treatment of erectile dysfunction in aged rats. **Life Sci.** 2012; 90: 489-94.
52. Holmquist F, Fridstrand M, Hedlund H, Andersson KE. Actions of 3-morpholinonyldonimin (SIN-1) on rabbit isolated penile erectile tissue. **J. Urol.** 1993; 150: 1310-1315.
53. Holmquist F, Hedlund H, Andersson KE. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **J Physiol.** 1992; 449: 295-311.
54. Holmquist f, Hedlund H, Andersson KE. L-N^G-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum. **Acta Physiol Scand.** 1991; 141: 441-442.
55. Hosogai N, Takakura S, Manda T, Mutoh S. Enzyme activities of the nitric oxide-cGMP pathway in corpus cavernosum isolated from middle-aged rats. **Eur J Pharmacol.** 2003; 473: 65-70.
56. Hsieh CH, Liu SP, Hsu GL, Chen HS, Molodysky E, Chen YH, Yu HJ. Advances in understanding of mammalian penile evolution, human penile anatomy and human erection physiology: clinical implications for physicians and surgeons. **Med Sci Monit.** 2012; 18: RA118-25.
57. Hurt KJ, Musicki B, Palese MA, Crone JK, Becker RE, Moriarity JL, et al. Akt dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2002; 99: 4061-6.

58. Hurt KJ, Sezen SF, Lagoda GF, Musicki B, Rameau GA, Snyder SH, Burnett AL. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012; 109: 16624-9.
59. Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. **Cell Mol Life Sci.** 2009; 66: 2503-24.
60. Idris Khodja N, Chataigneau T, Auger C, Schini-Kerth VB. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. **PLoS One.** 2012;7(2):e32039.
61. Ignarro L, Murad F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. **Advances in Pharmacology.** 1995; 34: 1-516.
62. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem Biophys Res. Commun.** 1990; 170: 843-850.
63. Imagawa A, Kimura K, Kawanishi Y, Tamura M. Effect of moxislyte hydrochloride on isolated human penile corpus cavernosum tissue. **Life Sci.** 1989; 44: 619-23.
64. Jablonski KI, Seals DR, Eskurza I, Monahan KD, Donato AJ. High-dose ascorbic acid infusion abolishes chronic vasoconstriction and restores resting leg blood flow in healthy older men. **J Appl Physiol.** 2007; 103: 1715-1721.
65. Jeremy JY & Mikhailidis DP. Cigarette smoking and erectile dysfunction. **J R Soc Health.** 1998; 118: 151-155.
66. Jeremy JY, Jones RA, Koupparis AJ, Hotston M, Persad R, Angelini GD, Shukla N. Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. **Int J Impot Res.** 2007; 19: 265-280.
67. Jeremy JY, Jones RA, Koupparis AJ, Hotston M, Persad R, Angelini GD, Shukla N. Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. **Int J Impot Res.** 2007; 19:265-80.
68. Jevtich Mj, Khawand Ny, Vidic B. Clinical significance of ultrastructural findings in the corpora cavernosa of normal and impotent men. **J Urol.** 1990; 143: 289-293.
69. Jiang F, Drummond GR, Dusting GJ. Suppression of oxidative stress in the endothelium and vascular wall. **Endothelium.** 2004; 11: 79-88.
70. Jiménez-Altayó F, Briones AM, Giraldo J, Planas AM, Salaices M, Vila E. Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-

- mediated relaxation in resistance arteries. **J Pharmacol Exp Ther.** 2006; 316: 42-52.
71. Jin L, Lagoda G, Leite R, Webb RC, Burnett AL. NADPH oxidase activation: a mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction. **J Sex Med.** 2008; 5: 544-51.
72. Jin L, Liu T, Lagoda GA, Champion HC, Bivalacqua TJ, Burnett AL. Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age associated erectile dysfunction. **FASEB J.** 2006; 20:536-538.
73. Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, McKinlay JB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J Urol.** 2000; 163: 460-463.
74. Kalsi JS, Ralph DJ, Thomas P, Bellringer J, Minhas S, Kell PD, Celtek S. A nitric oxide-releasing PDE5 inhibitor relaxes human corpus cavernosum in the absence of endogenous nitric oxide. **J Sex Med.** 2005; 2: 53-7.
75. Kalsi JS, Rees RW, Hobbs AJ, Royle M, Kell PD, Ralph DJ, Moncada S, Celtek S. BAY41-2272, a novel nitric oxide independent soluble guanylate cyclase activator, relaxes human and rabbit corpus cavernosum in vitro. **J Urol** 2003; 169:761-6.
76. Khan MA, Thompson CS, Jeremy JY, Mumtaz FH, Mikhailidis P, Morgan RJ. The effect of superoxide dismutase on nitric oxide-mediated and electrical field-stimulated diabetic rabbit cavernosal smooth muscle relaxation. **BJU Int.** 2001; 87: 98-103.
77. Kim N, Azadzi KM, Golstein I, Saenz de Tejada I. A nitric oxide-like factor mediates neurogenic relaxation of penile smooth muscle. **J Clin Invest.** 1991; 88: 112-118.
78. Kim N, Vardi Y, Padma-Nathan H, Daley J, Golstein I, Saenz de Tejada I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway: physiological role in penile erection. **J Clin Invest.** 1993; 91: 437-442.
79. Kirkeby HJ, Svane D, Poulsen J, Tottrup A, Forman A, Andersson KE. Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in relaxation of isolated human penile cavernous tissue and circumflex veins. **Acta Physiol Scand.** 1993; 149: 385-392.
80. Kloss S, Bouloumie A, Mulsch A. Aging and chronic hypertension decrease expression of rat aortic soluble guanylyl cyclase. **Hypertension.** 2000; 35: 43-7.
81. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovasc Res.** 1999; 43: 562-71.

82. Kowaluk EA, Seth P, Fung HL. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther.** 1992; 262:916-22.
83. Krane RJ, Goldstein I, Saenz de Tejada I. Impotence. **N Engl J Med.** 1989; 24: 1648-59.
84. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ Res.** 2012; 110: 1364-90.
85. Lee CW, Li D, Channon KM, Paterson DJ. L-arginine supplementation reduces cardiac noradrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats. **J Mol Cell Cardiol.** 2009; 47:149-55.
86. Leone AM, Wiklund NP, Hokfelt T, Brundin L, Moncada S. Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. **Neuroreport.** 1994; 5: 733-6.
87. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2004; 287: R1014-1030.
88. Li L, Smith A, Hagen Tm, Frei B. Vascular oxidative stress and inflammation increase with age: ameliorating effects of alpha-lipoic acid supplementation. **Ann N Y Acad Sci.** 2010; 203: 151-159.
89. Li M, Zhuan L, Wang T, Rao K, Yang J, Yang J, Quan W, Liu J, Ye Z. Apocynin improves erectile function in diabetic rats through regulation of NADPH oxidase expression. **J Sex Med.** 2012; 9: 3041-50.
90. Long T, Liu G, Wang Y, Chen Y, Zhang Y, Qin D. TNF- α , Erectile dysfunction, and NADPH oxidase-mediated ROS generation in corpus cavernosum in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. **J Sex Med.** 2012. 9:1801-14.
91. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev.** 2000; 52: 375-414.
92. Macarthur H, Westfall TC, Wilken GH. Oxidative stress attenuates NO-induced modulation of sympathetic neurotransmission in the mesenteric arterial bed of spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2008; 294: H183-9.
93. Mizusawa H, Hedlund P, Hakansson A, Alm P, Andersson KE. Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. **Br J Pharmacol.** 2001; 132(6): 1333-41.

94. Morrison JF, Pallot DJ, Sheen R, Dhanasekaran S, Mensah-Brown EP. The effects of age and streptozotocin diabetes on the sympathetic innervation in the rat penis. **Mol Cell Biochem.** 2007; 295: 53-8.
95. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. **Cardiovasc Res.** 2006; 71: 208-215.
96. Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL. Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis. **J Sex Med.** 2005; 2: 347-355.
97. Musicki B, Liu T, Lagoda GA, Strong TD, Sezen SF, Johnson JM, Burnett AL. Hypercholesterolemia-induced erectile dysfunction: endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling in the mouse penis by NAD(P)H oxidase. **J Sex Med.** 2010; 7: 3023-32.
98. Musicki B, Palese MA, Crone JK, Burnett AL. Phosphorylated endothelial nitric oxide synthase mediates vascular endothelial growth factor induced penile erection. **Biol Reprod.** 2004; 70(2): 282-9.
99. Muzaffar S, Shukla N, Jeremy JY. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase: a promiscuous therapeutic target for cardiovascular drugs? **Trends Cardiovasc Med.** 2005; 15: 278-282.
100. Nakashima A, Hayashi N, Kaneko YS, Mori K, Sabban EL, Nagatsu T, Ota A. Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines. **J Neural Transm.** 2009; 116: 1355-62.
101. Naughton C, Bennett k, Feely J. Prevalence of chronic disease in the elderly based on a national pharmacy claims database. **Age Ageing.** 2006; 35 (6): 633-666.
102. Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system of rat corpus cavernosum. **Free Radic Biol Med.** 2001; 31: 1287-312.
103. Numao N, Masuda H, Sakai Y, Okada Y, Kihara K, Azuma H. Roles of attenuated neuronal nitric-oxide synthase protein expression and accelerated arginase activity in impairing neurogenic relaxation of corpus cavernosum in aged rabbits. **BJU Int.** 2007: 1495-1499.
104. Nunes KP, Toque HA, Borges MH, Richardson M, Webb RC, de Lima ME. Erectile Function Is Improved in Aged Rats by PnTx2-6, a Toxin from Phoneutria nigriventer Spider Venom. **J Sex Med.** 2012; 9: 2574-81.

105. Okamura T, Ayajiki K, Toda N. Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. **Am J Physiol.** 1998; 274: H1075-H1081.
106. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev.** 2007; 87: 315-424.
107. Pacher P, Szabó C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. **Curr Opin Pharmacol.** 2006; 6: 136-141.
108. Park L, Anrather J, Girouard H, Zhou P, Iadecola C. Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2007; 27: 1908-1918.
109. Parrish DC, Gritman K, Van Winkle DM, Woodward WR, Bader M, Habecker BA. Postinfarct sympathetic hyperactivity differentially stimulates expression of tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2008; 294(1): H99-H106.
110. Pendyala S, Usatyuk PV, Gorshkova IA, Garcia JG, Natarajan V. Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: the role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins. **Antioxid Redox Signal.** 2009;11: 841-60.
111. Priviero FB, Zemse SM, Teixeira CE, Webb RC. Oxidative stress impairs vasorelaxation induced by the soluble guanylyl cyclase activator BAY 41-2272 in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypert.** 2009; 22: 493-9.
112. Puech-leao P, Reis Jm, Glina S, Reichelt AC. Leakage through the crural edge of the corpus cavernosum: diagnosis and treatment. **Eur Urol.** 1987; 13: 163-165.
113. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. **N. Engl. J. Med.** 1992; 326: 90-94.
114. Recio P, Lopez PG, Hernandez M, Prieto D, Contreras J, Garcia-Sacristan A. Nitrenergic relaxation of the horse corpus cavernosum. Role of cGMP. **Eur. J. Pharmacol.** 1998; 351: 85-94.
115. Saenz de Tejada I, Goldstein I & Krane RJ. Local control of penile erection: nerves, smooth muscle and endothelium. In: Krane RJ (ed.), Impotence. **Urol Clin North Amer Philadelphia: WB Saunders Co.** 1988; 15: 9-15.
116. Sattar AA, Wespes E, Schulman CC. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. **Eur Urol.** 1994 (2):142-4.

117. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. **J Mol Cell Cardiol.** 2002; 34: 379-388.
118. Schwarz P, Diem R, Dun NJ, Forstermann U. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. **Circ Res.** 1995; 77: 841-8.
119. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. **Lancet.** 2013; 381:153-65.
120. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, Apeler H, Dembowsky K, Feurer A, Gerzer R, Minuth T, Perzborn E, Pleiss U, Schröder H, Schroeder W, Stahl E, Steinke W, Straub A, Schramm M. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. **Nature.** 2001; 410: 212-5.
121. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H SA, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Muller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Muller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. **J Clin Invest.** 2006; 116: 2552-61.
122. Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ. Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1994; 11: 95-102.
123. Sullivan ME, Thompson CS, Dashwood MR, Khan MA, Jeremy JY, Morgan RJ, Mikhailidis DP. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? **Cardiovasc. Res.** 1999; 43: 658-665.
124. Sun D, Huang A, Yan EH, Wu Z, Yan C, Kaminski PM, Oury TD, Wolin MS, Kaley G. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2004; 286: H2249-H2256.
125. Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. **Hypertension.** 2007; 49: 241-248.
126. Teixeira CE, Bento AC, Lopes-Martins RA, Teixeira SA, Von Eickestedt V, Muscara MN, Arantes EC, Giglio JR, Antunes E, DE Nucci G. Effect of Tityus serrulatus scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrenergic nerve fibres. **Br J Pharmacol.** 1998, 123(3): 435-42.
127. Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. **J Pharmacol Exp Ther.** 2006; 316: 654-61.

128. Teles Ag, Carreira M, Alarcão V, Sociol D, Aragüés JM, Lopes L, Mascare-Nhas M, Costa JG. Prevalence, severity, and risk factors for erectile dysfunction in a representative sample of 3,548 portuguese men aged 40 to 69 years attending primary healthcare centers: results of the Portuguese erectile dysfunction study. **J Sex Med.** 2008; 5: 1317-1324.
129. Thompson IM, Tangen CM, Goodman PJ, Probstfield JL, Moinpour CM, Coltman CA. Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. **JAMA.** 2005; 294: 2996-3002.
130. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Nitric oxide and penile erectile function. **Pharmacol Ther.** 2005; 106(2): 233-66.
131. Tomada N, Tomada I, Cruz F, Vendeira P, Neves D. Characterization of VEGF and angiopoietins expression in human corpus cavernosum during aging. **J Sex Med.** 2010; 7:1410-1418.
132. Toque HA, Antunes E, Teixeira CE, De Nucci G. Increased cyclic guanosine monophosphate synthesis and calcium entry blockade account for the relaxant activity of the nitric oxide-independent soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in the rabbit penile urethra. **Urology.** 2008; 72: 711-5.
133. Toque HA, Priviero FB, Teixeira CE, Claudino MA, Baracat JS, Fregonesi A, De Nucci G, Antunes E. Comparative relaxing effects of sildenafil, vardenafil, and tadalafil in human corpus cavernosum: contribution of endogenous nitric oxide release. **Urology.** 2009; 74: 216-21.
134. Traish AM, Kim NN, Goldstein I, Moreland RB. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. **J. Androl.** 1999; 20(6): 671-82.
135. Ungvari Z, Orosz Z, Labinsky N, Rivera A, Xiangmin Z, Smith K, Csiszar A. Increased mitochondria H₂O₂ production promotes endothelial NF-κB activation in aged rat arteries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2007; 293: H37-H47.
136. Ungvari Z, Kaley G, De Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of Vascular Aging: New Perspectives. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** 2010; 65:1028-1041.
137. Van Der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Lüscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. **J Exp Med.** 2000; 192: 1731-1744.
138. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by

- geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 2002; 3: RESEARCH 0034.
139. Veras R. Population aging today: demands, challenges and innovations. **Rev Saude Publica.** 2009; 43: 548-554.
 140. Wang HX, Yang H, Han QY, Li N, Jiang X, Tian C, Du J, Li HH. NADPH oxidases mediate a cellular "memory" of angiotensin II stress I hypertensive cardiac hypertrophy. **Free Radic Biol Med.** 2013; 65C: 897-907.
 141. Wang R, Domer FR, Sikka SC, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Nitric oxide mediates penile erection in cats. **J Urol.** 1994; 151: 234-237.
 142. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. **Exp Biol Med (Maywood).** 2000; 227: 671-682.
 143. Yang J, Wang T, Yang J, Rao K, Zhan Y, Chen RB, Liu Z, Li MC, Zhuan L, Zang GH, Guo SM, Xu H, Wang SG, Liu JH, Ye ZQ. S-allyl cysteine restores erectile function through inhibition of reactive oxygen species generation in diabetic rats. **Andrology.** 2013; 1(3):487-94.
 144. Yiee JH, Baskin LS. Penile embryology and anatomy. **ScientificWorldJournal.** 2010; 10:1174-9.