

MÁRIO ANGELO CLAUDINO

***INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO NA FUNÇÃO
ERÉTIL DE RATOS COM DEFICIÊNCIA CRÔNICA DE
ÓXIDO NÍTRICO***

CAMPINAS

2008

MÁRIO ANGELO CLAUDINO

***INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO NA FUNÇÃO
ERÉTIL DE RATOS COM DEFICIÊNCIA CRÔNICA DE
ÓXIDO NÍTRICO***

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C571i Claudino, Mário Angelo
Influência do treinamento físico na função erétil de ratos com
deficiência crônica de óxido nítrico. / Mário Angelo Claudino.
Campinas, SP : [s.n.], 2008.

Orientador : Edson Antunes
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Disfunção erétil. 2. Corpo cavernoso. 3. Óxido nítrico. 4.
Hipertensão arterial. 5. Estresse oxidativo. 6. Treinamento físico.
I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Influence of physical training in the erectile function of
chronic NO-deficient rats**

Keywords: . **Erectile dysfunction**
. **Corpus cavernosum**
. **Nitric oxide**
. **Arterial hypertension**
. **Stress oxidative**
. **Physical training**

Titulação:Doutor em Farmacologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dr. Cláudio Alexandre Gobatto
Prof. Dr. Licio Augusto Velloso
Prof^a. Dr^a. Tania Cristina Pithon Curi
Prof^a. Dr^a. Maria Helena Catelli de Carvalho

Data da defesa: 20-06-2008



Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Prof. Dr. Edson Antunes

Membros:

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dr. Cláudio Alexandre Gobatto

Prof. Dr. Lício Augusto Velloso

Profa. Dra. Tania Cristina Pithon Curi

Profa. Dra. Maria Helena Catelli de Carvalho

Handwritten signatures in blue ink, including a large signature at the top and several smaller ones below, corresponding to the names in the list.

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

Data: 20/06/2008

DEDICATÓRIA

A Deus, Autor da Vida e Razão da minha existência...

A minha mãe Tianinha

*De quem Deus me deu a Honra de ser filho, responsável por cada
degrau por mim alcançado, meu exemplo, minha educadora.
Meu amor e minha gratidão por você é infinito... incomparável...
eterno...*

A minhas irmãs Carolina e Amary

*Pela alegria, amizade, carinho e amor... por permitirem e
acreditarem que seria possível... pelo incentivo nesta caminhada...*

A minha noiva Carla,

*Pela presença constante... por sua compreensão, respeito e
dedicação... Testemunha de minha jornada... minha incentivadora...
minha amiga... meu amor...*

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Edson Antunes,

Agradeço imensamente a confiança e a oportunidade de desenvolver este trabalho sob a tua orientação. Agradeço por ter me ensinado o caminho da pesquisa. E principalmente, agradeço a tua amizade durante estes anos.

A minha co-orientadora,

Profa. Dra. Angelina Zanesco,

Agradeço as oportunidades e contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelos ensinamentos e paciência ao me mostrar a necessidade de comprometimento com a ciência. Obrigado pela amizade, carinho e respeito.

Aos meus grandes amigos,

Prof. Dr. Cleber Evandro Teixeira e Fernanda Priviero,

Meu agradecimento especial por terem me recebido com tanto empenho e por todas as oportunidades que me ofereceram... Admiro a competência, dedicação, humildade e generosidade em tudo que fizeram... Serei eternamente grato

Agradecimentos

Agradeço ao meu Pai e grande amigo Sergio Motta, pelo apoio e respeito, e por sempre estar presente em minha vida.

Agradeço aos meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado, minha Madrinha Lourdes, meus tios Wenner e Cida, meus primos Daniela, Tatiana e Márcio e grande Lucy, por terem me acolhido com tanto respeito e carinho e por me incentivarem nesta caminhada.

Agradeço a minha nova família Itatibence, meu sogro Chico Penteado e minha sogra Regina Pretti, minhas cunhadas Chere e Juliana, meu concunhado Luis e a princesa da minha vida Anna Luisa, pelo apoio fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional, por compartilharem minha vida, meus sonhos e meu caminho em todos os momentos.

Agradeço a todos os grandes amigos de laboratório com quem dividi diretamente todos esses anos e com quem tive o prazer de conviver (galera da CASCATA), Camila Moraes, Clésio Pena, Fabio Ikeda, Fabíola Zacchia, Fernanda Dell, Fernando Báu, Haroldo Flores, Juliana Baracat, Juliano de Oliveira, Julio Joras, Maria Andrea Delbin, Marlon, Rafael Anovazzi, Renato Faro e Rodrigo Capel, pela amizade e companhia diária, pelo respeito e ajuda indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos meus amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Agata, Alessandra Linardi, Alice Bricola, Aline Maziero, Ana Cecília,

Cristina Okuyama, Cristiane Freitas, Elen Landucci, Enilton Camargo, Fábio, Fernanda e Marcelo Datti, Glaucia, Humberto, Ivani Souza, Juliana Moreira, Letícia Lintomen, Lineu, Luciana, Márcia Cardoso, Marina, Nadia, Priscila, Rafael Prada, Raquel Lorenzetti, Sara, Profa. Sisi Marcondes, Thomas, Tatiane Ferreira, agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.

Agradeço ao professor Dr. Gilberto De Nucci, por ter sempre me recebido bem, e agora dado a oportunidade de um pós-doutorado.

Agradeço aos amigos da USP, professor Dr. Marcelo Muscara, Ana Alice, Ana Augusta, Bruno, Denadai, Jamila, Paula, Rodrigo e Simone Teixeira, pelo trabalho em colaboração e principalmente pela amizade.

Aos meus grandes amigos de longa distância, Guilherme Augusto de Souza, Wilson Inácio Dias Junior e Marcelo Campos Crescencio, agradeço todo o apoio, força e amizade, tendo a certeza de poder contar sempre com vocês!

Agradeço aos funcionários Sr. Miguel e Marcos pela dedicação e cuidado com os animais no biotério que permite o desenvolvimento dos projetos deste departamento.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Wanderley, Elaine, Fran, Bruna, Toninho, Guina, José Hiton, Gildo e Adilson, pela agradável convivência e pelos serviços prestados.

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

*Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
pela concessão da bolsa de doutorado – 03/06951-5 (2003-2008).*

SUMÁRIO

LISTA DE DROGAS.....	xxv
LISTA DE ABREVIACOES.....	xxix
LISTA DE TABELAS.....	xxxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxxvii
RESUMO.....	xli
ABSTRACT.....	xliv
1. INTRODUÇÃO.....	49
1.1. FISILOGIA DA EREÇÃO PENIANA.....	53
1.1.1. <i>Anatomia Peniana</i>	53
1.1.2. <i>Neuroanatomia Peniana</i>	54
1.1.2.1. <i>Vias periféricas</i>	54
1.1.2.2. <i>Vias autonmicas</i>	54
1.1.2.3. <i>Vias somáticas</i>	55
1.2. HEMODINÂMICA DA EREÇÃO PENIANA.....	56
1.2.1. <i>Suprimento arterial</i>	56
1.2.2. <i>Drenagem venosa</i>	57
1.2.3. <i>Sistema sinusoidal</i>	57
1.3. MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA EREÇÃO PENIANA.....	58
1.4. PAPEL DO NO NA EREÇÃO PENIANA.....	59
1.5. DISFUNÇÃO ERÉTIL.....	61
1.6. HIPERTENSÃO ARTERIAL E DISFUNÇÃO ERÉTIL.....	62
1.7. INTERVENOES NÃO-FARMACOLÓGICAS: TREINAMENTO FÍSICO.....	63
1.8. ESTRESSE OXIDATIVO, DISFUNÇÃO ERÉTIL E ATIVIDADE FÍSICA.....	65
1.8.1. <i>Espécies reativas de oxigênio (ERO)</i>	65
1.8.2. <i>NADPH oxidase</i>	66
JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	69
OBJETIVOS.....	70
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
2.1. ANIMAIS.....	73
2.2. PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO.....	73

2.3. MODELO DE INIBIÇÃO CRÔNICA DE NO.....	74
2.4. MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	74
2.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	75
2.6. PREPARO DO CORPO CAVERNOSO ISOLADO DE RATOS.....	79
2.7. CURVAS CONCENTRAÇÃO-REPOSTA.....	80
2.8. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA.....	81
2.9. MONITORAMENTO DA PRESSÃO INTRACAVERNOSA (EXPERIMENTOS “IN VIVO”).....	81
2.10. DOSAGEM DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NO _x E ATIVIDADE PLASMÁTICA DA SOD.....	83
2.11. WESTERN BLOTTING.....	84
2.12. PREPARO DAS AMOSTRAS DE CORPO CAVERNOSO (PCR- REAL TIME).....	87
<i>Extração de RNA</i>	87
<i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	88
<i>Verificação da síntese de DNA complementar</i>	89
2.13. DESENHO DOS PRIMERS.....	89
2.14. PADRONIZAÇÕES NECESSÁRIAS PARA O PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL.....	90
2.14.1. <i>Concentração dos primers</i>	90
2.14.2. <i>Eficiência de reação</i>	91
2.15. PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL – “REAL TIME – PCR”.....	91
2.16. ANÁLISE DOS DADOS DE REAL TIME.....	92
2.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	93
3. RESULTADOS	95
3.1. EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA REATIVIDADE DA MUSCULATURA LISA CAVERNOSA.....	97
3.1.1. <i>Peso corporal</i>	99
3.1.2. <i>Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo SNP e nitrato de sódio acidificado (NaNO₂ acid.)</i>	100
3.1.3. <i>Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina</i>	102

3.1.4. <i>Contração de corpo cavernoso de ratos induzida pela PE e ET-1</i>	103
3.1.5. <i>Contração e relaxamento induzido pela estimulação elétrica (EFS)</i>	105
3.2. EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO FÍSICO NA FUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS DEFICIÊNTES CRÔNICOS DE NO.....	107
3.2.1. <i>Peso corporal</i>	109
3.2.2. <i>Pressão arterial sistólica</i>	110
3.2.3. <i>Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo SNP</i>	111
3.2.4. <i>Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina</i>	113
3.2.5. <i>Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo BAY 41-2272</i>	115
3.2.6. <i>Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo sildenafil</i>	117
3.2.7. <i>Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela EFS</i>	119
3.2.8. <i>Medida da pressão intracavernosa “in vivo”</i>	121
3.2.9. <i>Níveis plasmáticos de NOx</i>	123
3.3. EFEITO DO PÓS-TREINAMENTO NA FUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS DEFICIÊNTES CRÔNICOS DE NO.....	125
3.3.1. <i>Peso corporal</i>	127
3.3.2. <i>Pressão arterial sistólica</i>	128
3.3.3. <i>Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pelo SNP</i>	129
3.3.4. <i>Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina</i>	130
3.3.5. <i>Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela EFS</i>	131
3.3.6. <i>Medida da pressão intracavernosa “in vivo”</i>	132
3.3.7. <i>Níveis plasmáticos de NOx</i>	134
3.3.8. <i>Expressão protéica da nNOS e PnNOS</i>	135
3.3.9. <i>Expressão protéica do resíduo da nitrotirosina</i>	136
3.3.10. <i>Expressão protéica da SOD</i>	138
3.3.11. <i>Atividade plasmática da SOD</i>	139
3.3.12. <i>Expressão gênica da gp91phox</i>	140

4. DISCUSSÃO.....	141
5. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	155
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159
ANEXO.....	181

LISTA DE DROGAS

LISTA DE DROGAS

DROGAS

ACETILCOLINA
BAY 41-2272
ENDOTELINA-1
FENILEFRINA
GUANETIDINA
HALOTANO
N^o-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER
NITRATO DE SÓDIO
NITROPRUSSIATO DE SÓDIO
SILDENAFIL
URETANA

PROCEDÊNCIA

SIGMA (St. Louis, EUA)
BAYER AG (Wuppertal, ALE)
SIGMA (St. Louis, EUA)
SIGMA (St. Louis, EUA)
SIGMA (St. Louis, EUA)
LAB. CRISTÁLIA (Itapira, Brasil)
SIGMA (St. Louis, EUA)
SIGMA (St. Louis, EUA)
SIGMA (St. Louis, EUA)
LAB. CRISTÁLIA (Itapira, Brasil)
SIGMA (St. Louis, EUA)

MATERIAL USADO NO PCR

MATERIAL

PRIMERS
SYBER
SUPERScript III
BRAZOL

PROCEDÊNCIA

INVITROGEN (Carlsbad, EUA)
INVITROGEN (Carlsbad, EUA)
INVITROGEN (Carlsbad, EUA)
LGC Biotecnologia (Cotia, BRA)

LISTA DE ABREVIACÕES

LISTA DE ABREVIACÕES

3-NT: nitrotirosina

ACh: acetilcolina

Akt: treonina serina

AUC: área sob a curva

BAY 41-2272: (5-ciclopropil-2-[1-(2-fluorolbenzil)-1H-pirazolo[3,4,b]piridina-4-ylamine)

Ca²⁺: íon cálcio

CCR: corpo cavernoso de rato

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

C-SD: controle sedentário

C-TR: controle treinado

DNA: ácido desoxirribonucléico

EC-SOD: superóxido dismutase extracelular

EDTA: ácido etilenodiaminotetra acético

EFS: estimulação elétrica de campo

E_{max}: resposta máxima

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ET-1: endotelina-1

GAPDH: gliceraldeído fosfato desidrogenase

GCs: guanilato ciclase soluble

GDP: difosfato de guanosina

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

gp91 phox: glicoproteína 91 (phox)

GTP: trifosfato de guanosina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

ICP: pressão intracavernosa

L-Arg: L-arginina

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

LN-SD: L-NAME sedentário

LN-TR: L-NAME treinado

MAP: pressão arterial média
mmHg: milímetros de mercúrio
Na⁺: íon sódio
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótico fosfato
NANC: não-adrenérgico não-colinérgico
NaNO₂ acid.: nitrato de sódio acidificado
nNOS: óxido nítrico síntase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
NO_x: nitrito/nitrato
O₂⁻: ânion superóxido
ONOO⁻: peróxidonitrito
PCR: reação polimerásica em cadeia
PDE5: fosfodiesterase tipo 5
PE: fenilefrina
pEC₅₀: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo
PI3K: fosfatidil-inositol 3-kinase
PnNOS: óxido nítrico sintase neuronal peniana
RNA: ácido ribonucléico
ROS: espécies reativas de oxigênio
SHR: ratos espontaneamente hipertensos
SNP: nitroprussiato de sódio
SOD: superóxido dismutase
SOD-1 ou Cu/ZnSOD: superóxido dismutase cobre zinco
VO_{2máx}: volume máximo de oxigênio
XO: xantina oxidase

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência e tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de <i>primer</i> utilizado na amplificação dos genes estudados na técnica de PCR quantitativo em tempo real.....	90
Tabela 2. Peso corporal dos grupos controle sedentário (C-SD) e controle treinado (C-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo protocolo experimental n° 1.....	99
Tabela 3. Peso corporal dos grupos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo o protocolo experimental n° 2.....	109
Tabela 4. Pressão arterial sistólica dos grupos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas seguindo o protocolo experimental n° 2.....	110
Tabela 5. Peso corporal dos ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo o protocolo experimental n° 3.....	127
Tabela 6. Pressão arterial sistólica dos ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado	

(LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo o protocolo experimental nº 3..... 128

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de câmara de incubação de órgão isolado.....	79
Figura 2: Gel desnaturante, com amostras de RNA de corpos cavernosos de rato, amostras extraídas pela metodologia do Brazol e utilizadas na padronização do método de Real Time PCR. Gel realizado para confirmar a integridade das amostras, onde podemos verificar as subunidades 28s e 18S do RNA ribossomal.....	88
Figura 3: Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo SNP e nitrito de sódio acidificado (NaNO ₂ acid.).....	101
Figura 4: Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina.....	102
Figura 5: Contração de corpo cavernoso de ratos induzida pela PE e ET-1.....	104
Figura 6: Contração e relaxamento induzido pela estimulação elétrica (EFS)..	106
Figura 7: Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo SNP.....	112
Figura 8: Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina.....	114
Figura 9: Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pelo BAY 41-2272.....	116
Figura 10: Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pelo sildenafil.	118
Figura 11: Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela EFS.....	120
Figura 12: Medidas de pressão intracavernosa “ in vivo”.....	122
Figura 13: Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NO _x).....	123

Figura 14: Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo SNP.....	129
Figura 15: Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina.....	130
Figura 16: Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela EFS.....	131
Figura 17: Medidas de pressão intracavernosa “ in vivo”.....	133
Figura 18: Níveis plasmáticos de NOx.....	134
Figura 19: Expressão protéica da nNOS e PnNOS.....	135
Figura 20: Expressão protéica do resíduo da nitrotirosina.....	137
Figura 21: Expressão protéica da superóxido dismutase.....	138
Figura 22: Atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD).....	139
Figura 23: Expressão gênica da gp91phox.....	140

RESUMO

A disfunção erétil é definida como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana adequada para a satisfação sexual, e ocorre em graus variáveis prejudicando a qualidade de vida do homem. A disfunção erétil está associada a fatores de risco como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, envelhecimento, tabagismo e sedentarismo. O óxido nítrico (NO) é o principal mediador do relaxamento do músculo liso peniano. Evidências clínicas e experimentais indicam que a redução da disponibilidade de NO ou da reatividade ao NO endógeno leva à disfunção endotelial. Trabalhos recentes mostram que parte dos benefícios da atividade física regular no sistema cardiovascular é intensificar a produção de NO e/ou expressão da NOS pelas células endoteliais. Dessa forma, usando o modelo de inibição crônica da síntese de NO em ratos pelo L-NAME, investigamos os efeitos do treinamento físico regular na função erétil de ratos. Na primeira etapa, estudamos a influência do treinamento físico na função erétil de ratos saudáveis normotensos. Na segunda etapa, estudamos a influência do pré-condicionamento físico na função erétil de ratos submetidos a bloqueio crônico de NO. Na terceira etapa, avaliamos a eficácia terapêutica da atividade física regular na função erétil de ratos submetidos a bloqueio crônico de NO. Além das respostas funcionais (medidas de relaxamento de corpo cavernoso isolado e de pressão intracavernosa *in vivo*), realizamos a dosagem plasmática de nitrito/nitrato (NOx). A atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD), a expressão protéica da NO síntase neuronal (nNOS), da nitrotirosina (3-NT) e da SOD, assim como a expressão gênica da gp91phox foram analisadas no corpo cavernoso. Em ratos sedentários, nossos resultados mostraram que o exercício físico por 8 semanas ampliou a resposta relaxante mediada pelo NO (NaNO₂ acidificado), nitroprussiato de sódio (SNP) e estimulação

elétrica (EFS), sem alterar a resposta contrátil em resposta à fenilefrina (PE) e endotelina-1 (ET-1). Nos ratos com deficiência crônica de NO, o pré-condicionamento preveniu o aumento da pressão arterial e amplificou o relaxamento do corpo cavernoso induzido pelo SNP, ACh e EFS; porém, não alterou a resposta relaxante ao BAY 41-2272 e sildenafil. Além disso, o pré-condicionamento normalizou a pressão intracavernosa e os níveis plasmáticos de NOx. Ao avaliarmos o efeito do treinamento físico após instalação do bloqueio crônico de NO (eficácia terapêutica), notamos que a atividade física atenuou a hipertensão arterial, potencializou o relaxamento induzido pelo SNP e reverteu a redução do relaxamento em resposta à ACh e EFS. Além disso, normalizou a pressão intracavernosa e atenuou os níveis de NOx. A expressão protéica da nNOS e da PnNOS não foi alterada pela atividade física; porém, o aumento da nitração protéica (3-NT) foi prevenida pelo treinamento físico nos animais hipertensos. A expressão protéica da SOD não foi alterada pelo treinamento; entretanto, a atividade física regular atenuou a redução da atividade plasmática da SOD. Os níveis de expressão gênica da subunidade catalítica da NADPH oxidase, a gp91phox, foram reduzidos pela atividade física regular nos ratos deficientes crônicos de NO, e restaurados pelo pós-condicionamento. Portanto, concluímos que o treinamento físico (pré ou pós-condicionamento), é uma estratégia não-farmacológica eficiente capaz de reduzir o estresse oxidativo, aumentando a biodisponibilidade de NO, que resulta na melhora da disfunção erétil.

ABSTRACT

Erectile dysfunction is defined as the consistent or recurrent inability of a man to attain and/or maintain a penile erection sufficient for sexual activity, and can occur in different levels leading to an impairment of men's quality of life. Risk factors such as cardiovascular diseases, arterial hypertension, diabetes mellitus, hypercholesterolemia, aging, smoking and life sedentary increase the prevalence of erectile dysfunction. Nitric oxide (NO) is the main mediator of relaxation of penile smooth muscle. Clinical and experimental evidences suggest that decreased NO biodisponibility or NO reactivity contribute to erectile dysfunction. Recent studies have shown that part of beneficial effects of regular physical activity in the cardiovascular system is due to an increase in NO production and/or NOS expression by endothelial cells. Therefore, the aim of this work was to study the influence of run training on the erectile function from rats under chronic NO blockade by long-term treatment with L-NAME. First, we investigated the influence of physical training in the erectile function of healthy, normotense rats. Second, we studied the influence of prior physical conditioning in the erectile function of chronic NO-defficient rats. Third, we evaluated the therapeutic efficacy of regular physical activity (pós-conditioning) in the erectile function in chronic NO-defficient rats. To achieve this, we evaluated the functional responses (measurements of cavernosal relaxation *in vitro* and intracavernosal pressure *in vivo*) and the plasma levels of nitrite/nitrate (NO_x) and plasmatic superoxide dismutase (SOD) activity, protein expression of neuronal NOS (nNOS), nitrotyrosin (3-NT) and SOD, and gene expression of gp91phox in the corpus cavernosum. In healthy normotenses rats, physical training by 8 weeks improved the relaxant responses mediated by NO (added as acidified sodium nitrite solution; NaNO₂), sodium nitricprusside (SNP) and electrical field stimulation

(EFS), without affecting the contractile responses induced by phenylephrine (PE) and endothelin (ET-1). In NO-deficient rats, the prior physical conditioning attenuated the increased arterial pressure, and potentiated the relaxations of corpus cavernosum induced by SNP, ACh and EFS. However, no changes were found for BAY 41-2271 and sildenafil. In NO-deficient animals, the physical activity normalized the intracavernosal pressure and plasma NO_x levels. The post-conditioning (therapeutic efficacy) also attenuated the L-NAME induced arterial hypertension, potentiated the SNP-induced relaxations and reverted the reductions of relaxing responses to ACh and EFS. Furthermore, post-conditioning normalized the intracavernosal pressure and attenuated the plasma NO_x levels. Protein expression of nNOS and PnNOS were not affected by post physical activity. However, the increase of protein nitration (3-NT) was reversed by post-conditioning in the NO-deficient animals. The protein expression of SOD was not modified by exercise. Nevertheless, the physical activity attenuated the reduction of SOD plasma activity. The gp91phox expression was decreased in NO-deficient rats, and restored by physical training. In conclusion, we conclude that physical training (pre or post-conditioning) is an efficient non-pharmacological approach able to reduce the oxidative stress, increasing the NO bioavailability that results in an improvement of erectile dysfunction

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A disfunção erétil é definida como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana adequada para a satisfação sexual (*National Institutes of Health Consensus Statement*, 1993). A disfunção erétil ocorre em graus variáveis e prejudica a qualidade de vida, particularmente o bem-estar pessoal e as inter-relações familiares e sociais (Johannes *et al.*, 2000). Estima-se que a prevalência mundial de disfunção erétil acometa mais de 152 milhões de homens, e as projeções para 2025 mostram uma prevalência de aproximadamente 322 milhões. A disfunção erétil está associada a fatores de risco como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, envelhecimento, tabagismo e sedentarismo. Esses fatores de risco atuam de maneira sinérgica no desenvolvimento da arterosclerose aumentando a predisposição para a disfunção erétil (Jeremy & Mikhailidis, 1998; Sullivan *et al.*, 1999; Jeremy *et al.*, 2007).

Evidências clínicas e experimentais indicam que a redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO) e/ou da reatividade ao NO endógeno leva à disfunção endotelial. Demonstrou-se que a liberação de NO de fibras não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC) está prejudicada tanto em humanos quanto em animais submetidos à disfunção erétil (Azadzoi & Saenz de Tejada, 1991; Blanco *et al.*, 1990). A arteriosclerose aumenta a formação de ânion superóxido (O_2^-) e reduz a atividade de enzimas antioxidantes (Jeremy *et al.*, 2007). O O_2^- reage com NO formando o peróxidonitrito ($ONOO^-$), reduzindo a biodisponibilidade do NO, piorando a ereção peniana. Além disso, o $ONOO^-$ também se degrada formando óxidos de nitrogênio e radical hidroxila promovendo danos celulares (Khan *et al.*, 1999). Na última década, houve grandes avanços no

gerenciamento clínico da disfunção erétil, que compreendeu desde técnicas cirúrgicas e agentes administrados por vias intracavernosa e intra-uretral, até o desenvolvimento recente de terapia oral (inibidores de PDE5), que representa o início de terapias farmacológicas não-invasivas no tratamento da disfunção erétil.

A atividade física regular tem sido recomendada como terapia não farmacológica na prevenção ou no tratamento das doenças cardiovasculares. O exercício físico melhora a homeostase oxidativa, diminui os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), aumenta a resistência ao estresse oxidativo e a biodisponibilidade do NO (Cooper et al., 2002). Além disso, o aumento do *shear stress* (aumento da força de cisalhamento na parede vascular) pelo exercício físico parece estimular a produção de NO. Outros trabalhos mostram os benefícios do exercício na hemodinâmica cardiovascular, reduzindo a resistência vascular periférica através de aumento na produção de substâncias vasoativas como o NO (Scott 2002; Hamer 2006).

1.1. Fisiologia da Ereção Peniana

1.1.1. Anatomia peniana

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 glândula 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.*, 1994). O tecido erétil dos corpos cavernosos é composto de múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais, além das trabéculas, que formam as paredes dos espaços sinusoidais, e consistem de bandas espessas de músculo liso e de uma estrutura fibroelástica formada por fibroblastos, colágeno e elastina (Goldstein *et al.*, 1982; 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 no 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 bulbo cavernoso (ou bulbo esponjoso), ao passo que a crura peniana está circundada pelo músculo isquiocavernoso. A glândula peniana apresenta uma aparência de esponja devido a um vasto plexo venoso com um grande número de anastomoses.

1.1.2. Neuroanatomia peniana

1.1.2.1. Vias periféricas

A inervação do pênis é autonômica (vias simpáticas e parassimpáticas) e somática (vias sensoriais e motoras). A partir da coluna espinhal e dos gânglios periféricos, as inervações simpáticas e parassimpáticas confluem, formando o nervo cavernoso, 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).

1.1.2.2. Vias autonômicas

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; Dean & Lue, 2005).

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 (Walsh et al., 1990). A estimulação do plexo pélvico e do nervo cavernoso induz ereção, enquanto que a estimulação do tronco simpático causa detumescência.

1.1.2.3. Vias somáticas

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 inúmeras terminações aferentes (terminações nervosas livres e receptores corpusculares; Halata & Munge, 1986; Dean & Lue, 2005). 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 (McKenna, 1998; Dean & Lue, 2005). 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 (Burnett et al., 1993; Dean & Lue, 2005). 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).

1.2. Hemodinâmica da ereção peniana

1.2.1. Suprimento arterial

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, designado artérias dorsal, uretral (esponjosa), cavernosa e bulbar. A artéria dorsal adentra o pênis, sendo responsável pela rigidez da glande peniana durante a ereção. A artéria esponjosa (ou uretral) corre longitudinalmente através do corpo esponjoso lateral até a uretra. Durante seu curso, ela abastece o corpo esponjoso, tecido uretral e glande 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, e fornece sangue à glande e ao bulbo uretral proximal.

1.2.2. Drenagem venosa

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.

1.2.3. Sistema sinusoidal

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 e são consideradas unidades contráteis intrinsecamente ativas sensíveis aos estímulos neurológicos; dessa maneira, possuem papel fundamental nos mecanismos de ereção e detumescência.

1.3. Mecanismo fisiológico da ereção peniana

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 helicinal 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; Anderson & Wagner, 1995).

1.4. Papel do 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; Anderson, 2003). As enzimas responsáveis pela formação do NO são conhecidas como óxido nítrico síntases (NOS), encontradas nas fibras nitrérgicas (nNOS) e células endoteliais (eNOS). Essas enzimas catalisam o metabolismo da L-arginina (L-Arg), formando o NO e a 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.*, 2001) e no homem (Leone *et al.*, 1994; Ehmke *et al.*, 1995), a nNOS está localizada no plexo pélvico, nervos cavernosos e seus terminais nervosos no tecido erétil, além de nervos penianos dorsais e plexos nervosos na adventícia de artérias cavernosa e dorsal. Além disso, o endotélio também libera NO em resposta à acetilcolina (ACh) ou bradicinina no pênis (Saenz de Tejada *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1998, 2001). Recentemente, observou-se que a vasodilatação das artérias helicinais causada pela despolarização do nervo cavernoso leva à liberação de NO do endotélio sinusóide, como consequência do aumento do fluxo sanguíneo (Musicki *et al.*, 2004). Desta forma, a regulação da 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 fosfatidil-inositol 3-kinase (PI3K), fosforilando a proteína quinase B que, por sua vez, fosforila a eNOS levando à geração do NO no endotélio. Assim, acredita-se atualmente que a enzima nNOS inicia a resposta erétil enquanto que a eNOS ajuda na manutenção do estado erétil (Burnett, 2004).

Diversos estudos mostraram que inibidores da NOS têm a capacidade de bloquear o relaxamento do músculo liso do corpo cavernos induzido por estimulação elétrica das terminações NANC em várias espécies como coelho, cão, cavalo, macaco, rato, camundongo e humanos (Ignarro et al., 1990; Kim et al., 1991; Holmquist et al., 1992; Knispel et al., 1992; Kirkeby et al., 1993; Leone et al., 1994; Hayashida et al., 1996; Okamura et al., 1998; Recio et al., 1998; Hedlund et al., 1999; Mizusawa et al., 2001). O relaxamento neurogênico do músculo retrátil do pênis bovino e da artéria peniana também são bloqueados por estes inibidores (Liu et al., 1991; Martin et al., 1993; Simonsen et al., 1995). Inibidores de NOS também bloqueiam as respostas eretogênicas *in vivo* decorrentes da estimulação do nervo cavernoso no coelho, no camundongo, no gato e no rato (Holmquist et al., 1991; Burnett et al., 1992; Mills et al., 1992; Wang et al., 1994; Garbán et al., 1995; Escrig et al., 1999; Mizusawa et al., 2001). Portanto, o uso dos inibidores das NOS têm sido importante no esclarecimento do papel do NO na função erétil.

Sabe-se que quando liberado de fibras nitrérgicas ou do endotélio, o NO se difunde para células musculares lisas adjacentes e se liga ao seu receptor fisiológico intracelular, a guanilil 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 ativa a GCs (Lucas et al., 2000). A ativação desta enzima pelo NO leva à conversão de guanosina trifosfato (GTP) no segundo-mensageiro, monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A elevação dos níveis intracelulares de GMPc ativa proteínas quinase específicas, as quais fosforilam outras proteínas, ativam canais iônicos, e através destes eventos bioquímicos intermediários, leva à redução da concentração de cálcio intracelular, causando o relaxamento da musculatura lisa. 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).

1.5. Disfunção erétil

A etiologia da disfunção erétil é um processo multifatorial e pode ser de origem orgânica, neurogênica, ou ambas associadas. Na disfunção erétil orgânica, as causas mais comuns são de origem vasculogênica (Agarwal et al., 2006). Pacientes que apresentam doença vascular estão predispostos a desenvolver disfunção erétil vasculogênica (Bortolotti *et al.*, 1997; Jeremy & Mikhailidis, 1998; Sullivan *et al.*, 1999). A hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, doenças arteriais coronárias, tabagismo, envelhecimento e sedentarismo são considerados fatores de risco que atuam de maneira sinérgica no desenvolvimento da disfunção erétil vasculogênica.

1.6. Hipertensão arterial e disfunção erétil

A hipertensão arterial afeta de 20 a 25% dos adultos com idade entre 45 e 50 anos. Caracteriza-se principalmente pelo aumento da resistência vascular periférica causada por disfunção endotelial vascular, alterações morfofuncionais da musculatura lisa vascular e da matriz extracelular (Mulvany 1999). Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado uma forte associação entre hipertensão arterial e disfunção erétil. Aproximadamente 30% dos pacientes hipertensos possuem algum nível de disfunção erétil, que está diretamente relacionado à gravidade e ao período da hipertensão arterial (Burchardt et al., 2000). A deficiência de NO tem sido apontada como a principal causa da disfunção erétil nesta condição patológica (Muller et al., 1991; Burnett 1997; Aranda et al., 2004). As alterações morfológicas que ocorre no pênis de animais hipertensos envolvem danos na musculatura lisa cavernosa e no endotélio, aumento da proliferação da musculatura lisa e da deposição de colágenos, e redução do espessamento da túnica albugínea (Toblli et al., 2000; Jiang et al., 2005). As alterações da reatividade da musculatura lisa cavernosa estão associadas à diminuição da biodisponibilidade do NO, ao aumento do estresse oxidativo e da contratilidade da musculatura lisa. O relaxamento dependente de endotélio e neurogênico estão diminuídos em corpo cavernoso de ratos hipertensos (Ushiyama et al., 2004). Além disso, tem sido sugerido que o diagnóstico de disfunção erétil em “indivíduos saudáveis” possa indicar alterações precoces no sistema vascular; dessa forma, a disfunção erétil pode ser considerada um importante fator no diagnóstico de doenças cardiovasculares (Russell et al., 2004).

1.7. Intervenções não-farmacológicas: Treinamento Físico

Estudos epidemiológicos mostram que a atividade física aeróbia diária previne a morbidade e mortalidade de doenças cardiovasculares (Castelli 1984; Paffenbarger et al., 1993). Além disso, o estado sedentário *per se* é considerado um fator de risco para as doenças cardiovasculares, aumentando em 1,5 vezes o desenvolvimento de hipertensão quando comparados a indivíduos que praticam atividade física (Blair et al., 1984). Os exercícios aeróbios são mais eficientes como terapia alternativa ou concomitante com terapia farmacológica para o tratamento da hipertensão arterial leve ou moderada. Os programas de condicionamento físico para hipertensos preconizam que os exercícios devem ser realizados cinco vezes por semana, durante pelo menos 30 minutos por sessão. Exercícios de baixa e moderada intensidade (40-60% de VO₂ máximo) parecem acarretar melhores resultados na redução da pressão arterial do que exercícios de maior intensidade. Exercícios aeróbios como ciclismo, natação, subir e descer escadas, corrida leve em esteira ou em movimento (trotar) são os que desencadeiam melhores resultados na redução da pressão arterial (Franklin *et al.*, 1991).

Os efeitos benéficos da atividade física no controle da pressão arterial podem ser definidos em dois aspectos: preventivo e terapêutico. Os aspectos preventivos envolvem promoção à saúde e prevenção do estado hipertensivo em indivíduos com predisposição para o desenvolvimento da doença. Os aspectos terapêuticos envolvem a redução dos níveis de pressão arterial, melhora no perfil lipídico e diminuição da mortalidade (Zago & Zanesco, 2006). Dados experimentais mostraram que a redução da pressão arterial após exercício dinâmico crônico é maior em indivíduos hipertensos do que em normotensos,

tanto em humanos quanto em animais de laboratório (Duncan *et al.*, 1985; Kenney & Seals, 1993). Trabalhos prévios mostraram que a hipertensão arterial pode ser reduzida ou prevenida pela atividade física regular em humanos (Kingwell 2000; Lesniak & Dubbert 2001). Além disso, o exercício físico é eficiente no controle da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (Tipton *et al.*, 1982; Horta *et al.*, 2005).

Mecanismos complexos e múltiplos foram propostos para explicar a redução da pressão arterial decorrente do treinamento físico, como redução do tônus simpático (Leblanc *et al.*, 1977), aumento da sensibilidade dos barorreceptores aórticos e carotídeos (Krieger *et al.*, 1998), aumento da sensibilidade dos adrenoreceptores β_2 vasculares e/ou diminuição da sensibilidade dos adrenoreceptores α (Shen *et al.*, 1990), alterações do número de receptores adrenérgicos (Tipton *et al.*, 1982), diminuição dos níveis plasmáticos de renina e aldosterona (McCrimmon *et al.*, 1976; Melin *et al.*, 1980), liberação de opióides endógenos (Hartley *et al.*, 1972), aumento da liberação de peptídeos nos átrios e nos ventrículos (Freud *et al.*, 1988) e maior produção de fatores relaxantes derivados do endotélio (Sessa *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1990; Flavahan & Vanhoutte 1995). Dados obtidos em animais de laboratório e humanos mostraram também que os benefícios da atividade física regular no sistema cardiovascular podem ser decorrentes de interferências na produção de NO e/ou da expressão da NOS (Rush *et al.*, 2005; Linke *et al.*, 2006), assim como do estresse oxidativo, conforme detalhado a seguir.

1.8. Estresse oxidativo, disfunção erétil e atividade física

1.8.1. Espécies reativas de oxigênio (ERO)

O estresse oxidativo ocorre quando o sistema antioxidante não consegue controlar a produção excessiva de ERO, que são produtos da fosforilação oxidativa, e desempenham papel importante no controle do estado redox normal das vias de sinalização fisiológicas. No entanto, 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).

As ERO incluem radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que podem ser convertidos em radicais livres, os quais participam de reações bioquímicas em condições fisiológicas ou patológicas (Giordano et al., 2005). O O_2^- é formado pela ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), da xantina oxidase (XO) ou da liberação de elétrons durante a fosforilação das mitocôndrias (Sawyer et al., 2002; Giordano et al., 2005; Murdoch et al., 2006). O H_2O_2 é gerado pelo aumento dos níveis do OH^\cdot (Giordano et al., 2005).

As células possuem um sistema antioxidante que atua contra o acúmulo das ERO; esse sistema, sob condições normais, atua de forma eficiente promovendo baixos níveis de ERO. O sistema antioxidante é formado por enzimas antioxidantes intracelulares, como a catalase, a glutatona 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 os radicais livres. A SOD converte o O_2^- para H_2O_2 , que posteriormente é convertido pela catalase e glutatona em água (Takimoto & Kass 2007). Entretanto, o sistema antioxidante, apesar de eficiente, não remove completamente os radicais livres gerados pelas células. Isto é de fundamental importância, pois os radicais livres, apesar de deletérios também desempenham funções biológicas benéficas, participando no processo de fagocitose de bactérias e vírus no organismo (Takimoto & Kass 2007).

1.8.2 NADPH oxidase

A NADPH oxidase é a principal precursora para a formação de ERO na parede vascular (Sirker et al., 2007). A NADPH oxidase é composta por uma subunidade catalítica denominada NOX e subunidades regulatórias citosólicas (p22phox, p40phox, p47phox e p67phox) e Rac, uma pequena proteína de ligação do GTP. A transferência do elétron da NADPH oxidase para a molécula de oxigênio no sítio catalítico resulta na formação do O_2^- . Existem 5 isoformas da NOX (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5), expressa em diversos tecidos. A NOX2 (gp91phox) é a principal isoforma envolvida na fagocitose clássica da NADPH oxidase. É expressa em diversos tipos celulares como fibroblastos (Pagano et al., 1997), cardiomiócitos (Bendall et al., 2002; Satoh et al., 2006) e células endoteliais (Frey et al., 2002; Li & Shah 2003). As outras isoformas provavelmente importantes no sistema cardiovascular incluem a NOX1, expressa em

células lisas vasculares (Lassegue et al., 2001), e a NOX4, expressa em fibroblastos, células endoteliais, cardiomiócitos e células do músculo liso vascular (Pagano et al., 1997; Ago et al., 2004; Li et al., 2006; Clempus et al., 2007).

O aumento da expressão e da atividade do complexo NADPH oxidase tem sido implicado na etiologia das 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). Sabe-se que a redução da atividade da eNOS (como consequência de doenças cardiovasculares) no tecido vascular resulta no aumento da expressão da NADPH oxidase, acarretando consequentemente aumento da formação de O_2^- , o qual reage com a molécula de NO formando um reativo intermediário, o ONOO⁻. Posteriormente, este se degrada formando óxidos de nitrogênio e radical hidroxila, promovendo danos às células endoteliais (Khan *et al.*, 1999; Kojda & Harrison, 1999). Além disso, o aumento da produção de ERO induz redução da atividade da SOD, aumentando o estado de estresse oxidativo, ampliando os danos celulares (Jin & Burnett 2008).

O exercício físico crônico de intensidade moderada altera positivamente a homeostase oxidativa das células e tecidos, por diminuir os níveis basais de danos oxidativos e aumentar a resistência ao estresse oxidativo (Cooper *et al.*, 2002). Esta redução dos danos oxidativos pelo exercício físico aumenta a biodisponibilidade de NO. O NO se destaca, portanto, como um importante regulador metabólico e hemodinâmico durante o desempenho da atividade física (Kingwell, 2000). Além disso, o exercício

físico aumenta a expressão das *heat-shock proteins*, proteínas de estresse com função de reparo e prevenção de danos teciduais (Hamilton *et al.*, 2003; Siu *et al.*, 2004).

O exercício físico promove aumento do fluxo sanguíneo em diferentes leitos vasculares, principalmente no tecido muscular esquelético (Posch *et al.*, 1999). O mecanismo de controle do fluxo sanguíneo da musculatura esquelética durante o exercício é complexo, e envolve sistemas neural, endotelial, metabólico e miogênico (Delp, 1993). O aumento do fluxo sanguíneo durante o exercício físico aumenta a força de cisalhamento (*shear stress*), que é um estímulo mecânico eficaz para a produção de NO. O *shear stress* estimula o endotélio, aumentando o transporte de L-arginina, os níveis de Ca^{2+} intracelulares, a atividade e a expressão da eNOS e a atividade da SOD, promovendo maior disponibilidade de NO para os tecidos (Posch *et al.*, 1999).

Recentemente, demonstrou-se que o aumento da produção de ERO está associado com a disfunção erétil em diferentes modelos patológicos como hipercolesterolemia e hipertensão arterial (Shunkla *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007). Além disso, estudos mostraram que o aumento de ERO reduz a biodisponibilidade de NO, piorando a função endotelial e a atividade erétil (Keegan *et al.*, 1999; Burnett *et al.*, 2006). Por isso, estratégias terapêuticas têm focado na restauração de mecanismos antioxidantes no pênis. Entretanto, outro importante aspecto é o bloqueio das fontes de ERO, uma vez que a produção excessiva de ERO sob condições patológicas reduz os mecanismos antioxidantes causando danos celulares. Estudos recentes mostram que a NADPH oxidase representa a principal fonte de ERO na disfunção erétil decorrente de hipercolesterolemia e hipertensão arterial (Shunkla *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007).

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A atividade física regular tem sido recomendada como terapia não farmacológica na prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares como hipertensão leve ou moderada. Visto que a disfunção erétil está estreitamente relacionada a doenças cardiovasculares, decidimos estudar a influência do treinamento físico na atividade erétil de ratos saudáveis e submetidos a bloqueio crônico de NO.

Quando iniciamos o projeto não havia nenhum estudo abordando os possíveis efeitos benéficos do treinamento físico regular na função erétil de animais saudáveis ou sob estados patológicos. Desta forma, adotamos o modelo de inibição crônica da síntese de NO em ratos pelo L-NAME, modelo este implementado há longa data pelo grupo (Ribeiro et al., 1992). Está bem estabelecido que a inibição crônica de NO em ratos causa hipertensão arterial, remodelamento vascular, alterações no sistema antioxidante, aumento de ERO e alterações da reatividade da musculatura lisa. Entendemos que o projeto ora proposto é relevante para a área de saúde pública e qualidade de vida de indivíduos com disfunção erétil.

OBJETIVOS

Objetivos gerais

1. Avaliar a influência do pré-condicionamento físico na reatividade da musculatura lisa cavernosa de ratos saudáveis normotensos;
2. Avaliar a influência do pré-condicionamento e do pós-condicionamento físico na função erétil de ratos submetidos a bloqueio crônico de NO.

Objetivos Específicos

Estudos funcionais

- Realização de curvas concentração-efeito *in vitro* a agentes relaxantes (acetilcolina, nitroprussiato de sódio, NaNO₂ acidificado, BAY 41-2272 e sildenafil) e contráteis (fenilefrina e endotelina-1) em corpos cavernoso isolados de ratos sedentários e treinados, submetidos ou não ao tratamento crônico com L-NAME;
- Realização de curvas frequência-efeito *in vitro* avaliando os efeitos relaxantes e contráteis à estimulação elétrica em corpos cavernosos de ratos sedentários e treinados, submetidos ou não ao tratamento crônico com L-NAME;
- Avaliação da pressão intracavernosa dos animais sedentários e treinados, submetidos ou não ao tratamento crônico com L-NAME;

Estudos bioquímicos e moleculares

- Dosagem dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato e da atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD) nos animais sedentários e treinados, submetidos ou não ao tratamento crônico com L-NAME;
- Avaliação da expressão protéica da nNOS, da SOD e da nitrotirosina em corpos cavernosos de ratos sedentários e treinados, submetidos ou não ao tratamento crônico com L-NAME;
- Determinação da expressão gênica da glicoproteína gp91phox em corpos cavernosos de ratos sedentários e treinados, submetidos ou não ao tratamento crônico com L-NAME.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Ratos Wistar machos (200-250g) foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro (12/12 h), e tratados com ração e água *ad libidum*. Os protocolos empregados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 763-1).

2.2. Programa de exercício físico dinâmico

As sessões de exercício físico foram realizadas em esteira ergométrica elétrica, em baias individuais, com as seguintes dimensões: 0,70 m de largura, 0,45 m de altura e 1,35 m de comprimento. Na primeira semana de estudo, os animais passaram por um período de adaptação à esteira, iniciando com velocidade de 0,6 Km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente até atingir a velocidade de 1,2 Km/h durante 60 minutos. Isto corresponde a 66% da VO_{2max} , de acordo com nossa experiência prévia (Priviero *et al.*, 2001). Somente os animais adaptados à corrida em esteira foram usados no estudo. Passada a semana de adaptação, o programa de corrida em esteira foi realizado 5 dias por semana, em sessões de 60 minutos, a fim de avaliar o efeito preventivo (pré-condicionamento) ou terapêutico (pós-condicionamento) do treinamento. Após o término do período total de treinamento, os animais foram mantidos em repouso por 48 horas,

quando então foram anestesiados para a coleta de material para posteriores dosagens e ocorreu o isolamento dos corpos cavernosos, para medidas de pressão intracavernosa *in vivo*.

2.3. Modelo de inibição crônica de NO

O tratamento crônico com L-NAME foi realizado como descrito previamente (Ribeiro *et al.*, 1992). A ingestão hídrica foi inicialmente medida a fim de se definir a ingestão diária de água dos animais, que em nossas condições de biotério é de aproximadamente 50 ml/dia/rato; assim, o L-NAME foi dissolvido na concentração de 40 ou 200 mg/L, e oferecido através de ingestão hídrica normal (água de torneira), de forma que a dose diária fosse de aproximadamente 2 ou 10 mg/rato/dia. Animais controle foram submetidos às mesmas condições experimentais, porém receberam apenas água de torneira.

2.4. Medida de pressão arterial sistólica

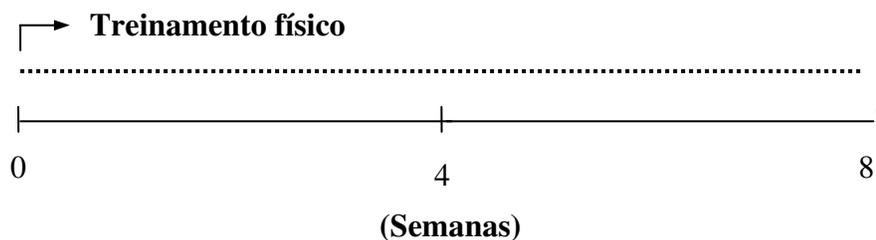
As pressões dos animais foram determinadas antes de se iniciar o treinamento e/ou tratamento com L-NAME, sendo consideradas como médias basais. Iniciado o treinamento e/ou tratamento, as pressões arteriais foram aferidas ao final de cada protocolo experimental. Para a medida das pressões arteriais, os animais foram colocados em gaiolas aquecidas à temperatura de aproximadamente 38°C por 20 minutos, para

provocar dilatação dos vasos caudais. Após este período, os animais foram colocados em um contensor modelo 1262 (Narco Bio Systems, inc, Houston, Texas, EUA). Na cauda do animal, adaptou-se um manguito acoplado a um sistema de microfones capaz de captar sinais de 0,5 mv de amplitude. O registro foi visualizado através de um osciloscópio modelo CS 4025 (Kenwood Corporation, Japão). O manguito foi inflado até 200 mmHg, de modo a não se visualizarem suas pulsações. Em seguida era desinsuflado até reiniciarem as pulsações, e o valor da pressão arterial era lido no manômetro (Zatz, 1990). As medidas foram consideradas válidas quando não houve variações significativas, isto é, acima de 5 mmHg. Estas medidas de pressão arterial foram realizadas em sala isolada e silenciosa.

2.5. Protocolos experimentais

Protocolo nº 1

O seguinte protocolo experimental foi realizado para avaliar o efeito do exercício físico na resposta erétil de ratos saudáveis. Os animais foram submetidos ao treinamento físico em esteira por um período total de 8 semanas (veja esquema abaixo).



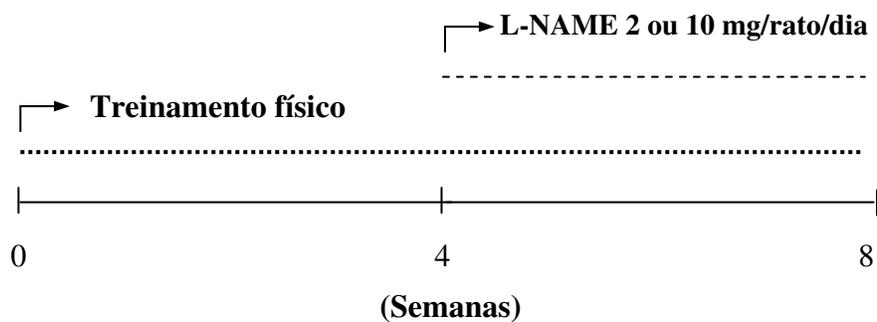
Grupos experimentais:

1a. *Grupo controle sedentário (C-SD)*: ratos não treinados; ração e dieta hídrica normal (água de torneira);

1b. *Grupo controle treinado (C-TR)*: ratos treinados em esteira; ração e dieta hídrica normal (água de torneira).

Protocolo nº 2

Para avaliar o efeito do pré-condicionamento físico na resposta erétil de ratos tratados cronicamente com L-NAME, o seguinte protocolo experimental foi realizado. Os animais foram submetidos ao treinamento físico em esteira por um período total de 8 semanas, sendo que nas quatro primeiras semanas os animais foram apenas treinados (pré-condicionamento físico). Ao fim da quarta semana, foi introduzido o tratamento crônico com L-NAME, que continuou concomitantemente ao programa de treinamento físico até a oitava semana (veja esquema abaixo).



Grupos experimentais:

1a. *Grupo controle sedentário (C-SD)*: ratos não treinados; dieta hídrica normal (água de torneira);

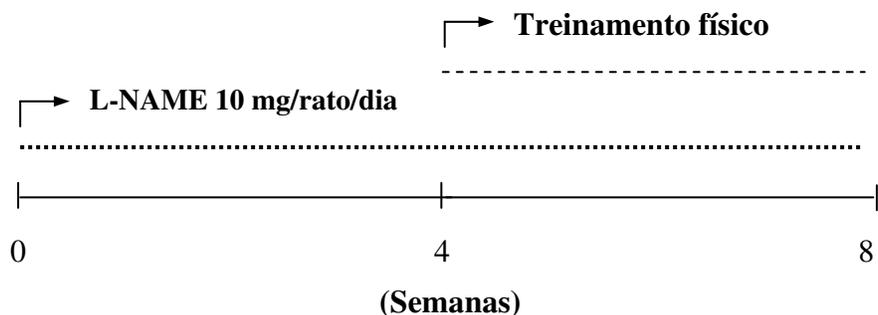
1b. *Grupo controle treinado (C-TR)*: ratos treinados em esteira; dieta hídrica normal (água de torneira);

2a. *Grupo L-NAME sedentário (LN-SD)*: ratos sedentários e tratados com L-NAME (administrado na ingestão hídrica na dose de 2 ou 10 mg/rato/dia);

2b. *Grupo L-NAME treinado (LN-TR)*: ratos treinados e tratados com L-NAME (administrado na ingestão hídrica na dose de 2 ou 10 mg/rato/dia).

Protocolo nº 3

Para avaliar o efeito do pós-condicionamento físico (eficácia terapêutica) na resposta erétil dos animais, o seguinte protocolo experimental foi realizado. Os animais foram submetidos ao tratamento crônico com L-NAME por um período de 8 semanas. Ao fim da quarta semana, foi introduzido o programa de treinamento físico que continuou concomitantemente ao tratamento com L-NAME até a oitava semana (veja esquema abaixo).



Grupos experimentais:

1a. *Grupo controle sedentário (C-SD)*: ratos não treinados; dieta hídrica normal (água de torneira);

1b. *Grupo controle treinado (C-TR)*: ratos treinados em esteira; dieta hídrica normal (água de torneira);

2a. *Grupo L-NAME sedentário (LN-SD)*: ratos sedentários e tratados com L-NAME (administrado na ingestão hídrica na dose de 10 mg/rato/dia);

2b. *Grupo L-NAME treinado (LN-TR)*: ratos treinados e tratados com L-NAME (administrado na ingestão hídrica na dose de 10 mg/rato/dia);

2.6. Preparo do corpo cavernoso isolado de rato

Para isolamento do corpo cavernoso, os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg i.p.), após o qual foi coletado o sangue para análises. O pênis foi retirado na região de inserção da crura e imediatamente colocado em solução de Krebs-Ringer 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 dos tecidos conectivos e da túnica albugínea, o tecido cavernoso



Figura 1: Sistema de câmara de incubação para órgão isolado.

foi dissecado e isolado. Cada pênis forneceu dois segmentos de corpos cavernosos dissecados (aproximadamente 1.0 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 (Figura 1). 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 (Ugo-Basile, Varese, Itália) e registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (software versão 4.2, AD Instruments, MA, E.U.A).

Para o estudo da estimulação elétrica (EFS), os tecidos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos de forma paralela. A estimulação elétrica foi realizada através de estimulador Grass S88 (Quincy, MA, EUA), pela geração de pulsos de 1 ms de

duração a 50 V em frequências variadas (2-32 Hz), conforme nossa experiência prévia (Teixeira et al., 1998; 2005).

2.7. Curvas concentração-resposta

Após o período de estabilização, a viabilidade e integridade dos tecidos foram testada utilizando-se solução rica em potássio (KCl 118 mM, substituindo-se o Na⁺ para manter a osmolaridade da solução). Em seguida, respostas relaxantes aos doadores de NO, nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM -1 mM), nitrato de sódio acidificado (NaNO₂ acid., 100 nM – 100 µM), ao agonista muscarínico, acetilcolina (ACh, 10 nM -1 mM), ao inibidor da PDE5, sildenafil (1 nM - 10 µM) e ao estimulador da GCs, BAY 41-2272 (1 nM - 10 µM) foram obtidas em corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina (10 µM). Em algumas preparações de corpo cavernoso, avaliou-se a resposta contrátil construindo-se curvas concentração-resposta à fenilefrina (10 nM - 100 µM) e endotelina-1 (ET-1, 10 pM - 100 nM). As curvas concentração-resposta foram obtidas através do aumento cumulativo das concentrações das drogas em questão em meia ou uma unidade logarítmica (Van Rossum, 1963). A análise de regressão não-linear para determinar os parâmetros de E_{max} e -log EC₅₀ (pEC₅₀) foi obtida com o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

2.8. Estimulação elétrica

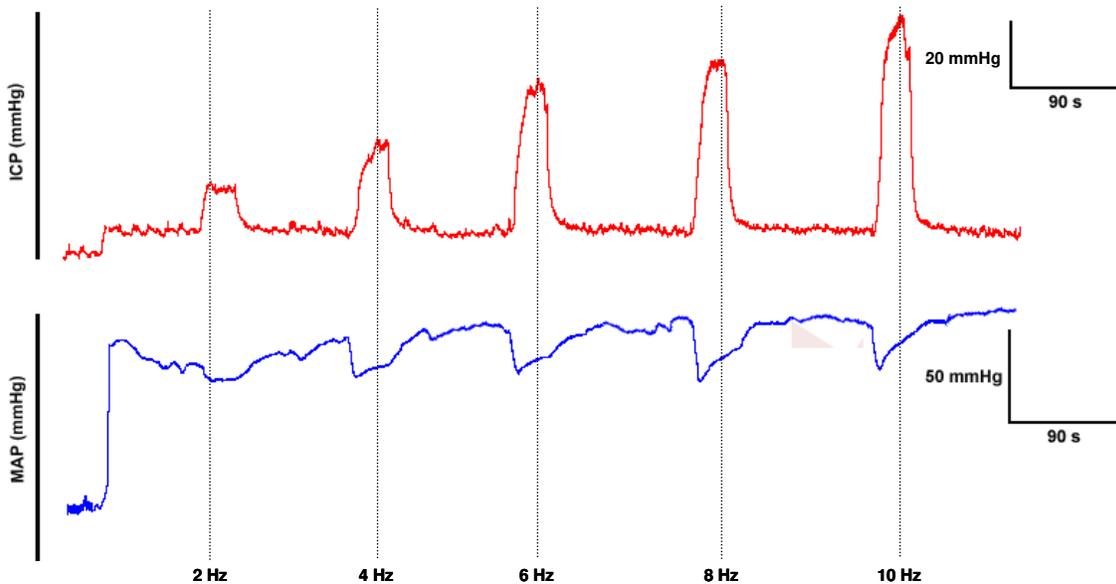
Após o período de estabilização e avaliação da viabilidade dos tecidos utilizando-se KCl (118 mM), as respostas relaxantes à estimulação elétrica (EFS, 2-32 Hz) foram obtidas em tecidos previamente tratados com guanetidina (30 μ M) para esgotamento das terminações adrenérgicas e atropina (1 μ M) para bloquear a resposta muscarínica. Em seguida, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina para construção da curva frequência-resposta (2-32 Hz). Em algumas preparações de corpo cavernoso, avaliou-se a resposta contrátil induzida pelo EFS, conforme experiência prévia do grupo (Teixeira et al., 1998; 2005).

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

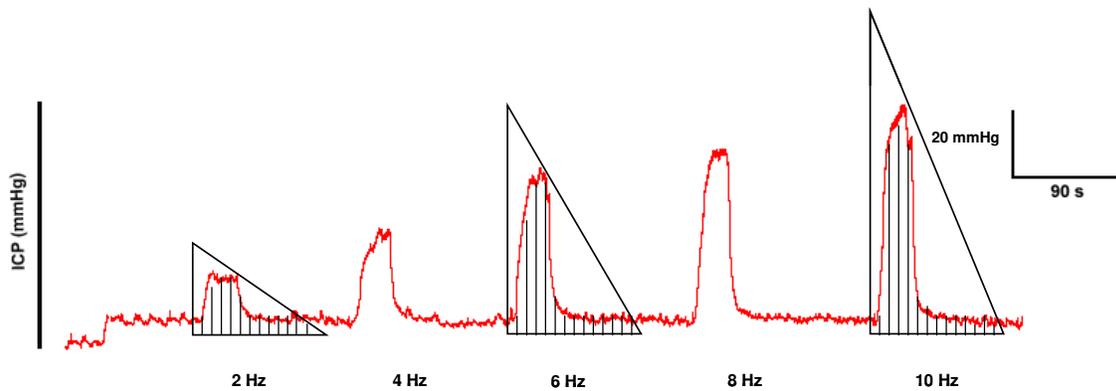
Os animais foram anestesiados com uretana (1,2g / kg) por via intraperitoneal. A artéria carótida direita foi canulada para monitoramento contínuo da pressão arterial média (MAP). Uma cânula provida de agulha 26G foi inserida no corpo cavernoso esquerdo para registro da pressão intracavernosa (ICP), usando-se transdutores de pressão (Grass, Astro-Med Industrial Park, EUA). A cavidade abdominal foi aberta expondo o nervo cavernoso esquerdo, localizado na região dorso-lateral da próstata. Um eletrodo bipolar de platina conectado a um estimulador (Grass S48, Quincy, MA, EUA) foi posicionado sobre o nervo cavernoso. Estimulações elétricas do nervo cavernoso (pulso de 1 ms, 45 s, 6 V) a diferentes frequências (2,4,6,8 e 10 Hz) foram aplicadas. As

alterações de tensão foram registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (software versão 4.2, AD Instruments, MA, EUA).

Para se avaliar a atividade erétil *in vivo*, adotamos dois parâmetros bastantes utilizados na literatura, a razão ICP/MAP (pressão intracavernosa/pressão arterial média) e área sob a curva (AUC). A razão ICP/MAP é utilizada para se avaliar a atividade erétil quando a pressão arterial está alterada, que é o caso do presente projeto. O cálculo é realizado dividindo o pico máximo da ICP (independente da frequência utilizada) pela MAP como mostrado na figura abaixo:



A AUC é utilizada quando não se observa alterações de tensão, mas sim de tempo de resposta ao estímulo elétrico. O cálculo é feito a partir do início da estimulação elétrica (duração do estímulo 45 s); assim, se seleciona uma área de 90 s, que é o tempo necessário para o retorno da resposta aos valores basais de pressão intracavernosa, como mostrado na figura abaixo:



2.10. Dosagem dos níveis plasmáticos de NOx e atividade plasmática da SOD

Separação do plasma

Amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal em tubos contendo citrato ou EDTA (conforme instrução do fabricante), centrifugados à 1.000 g por 10 minutos, à 4°C, para separação do plasma. As amostras de plasma foram aliquotadas e armazenadas em freezer à -80°C até a realização das dosagens.

NO_x

As amostras de plasma foram ultra-filtradas, usando-se tubos de ultra-filtração (Millipore) que permitem a exclusão de moléculas com peso molecular entre 10 a 30 kDa. Os filtros foram lavados com água ultra-pura antes da filtração. O preparo das amostras, dos padrões, dos cofatores e do reagente de Griess foi realizado de acordo com a descrição dos kits comercialmente disponíveis (Nitrato/Nitrito Colorimetric Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, E.U.A.). Os ensaios foram realizados em duplicatas.

Atividade da SOD

Para a dosagem da atividade da SOD, após centrifugação do sangue, a camada branca contendo leucócitos foi desprezada. Os eritrócitos foram lisados em água ultra pura gelada, em volume 4 vezes maior do que o do plasma, e então centrifugados a 10.000 g, por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante contendo o eritrócito lisado foi coletado e estocado em gelo e utilizado para a dosagem da atividade da SOD. O preparo das amostras, dos padrões, da xantina oxidase e do detector do radical foi realizado de acordo com a descrição do fabricante (Superoxide Dismutase Assay Kit; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, E.U.A.). Os ensaios foram realizados em duplicatas.

2.11. Western Blotting

Amostras de corpo cavernoso contendo 130 µl da concentração de proteínas totais (3 mg/ml) foram diluídas com 30 µl de tampão de Laemmli (0,0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromo fenol e 5% de 2-

mercaptoetanol) e fervidas durante 10 min. Após rápida centrifugação a 10.000 g (30 seg.), as proteínas (25 µg/lane para nNOS e 3-NT, e 7,5 µg/lane para SOD-1) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (7% para nNOS, 10% para 3-NT e 15% para SOD-1) contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio (SDS - PAGE; Laemmli, 1970). A composição do tampão utilizado na corrida eletroforética foi à seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1%) ajustado para pH 8,3. A separação eletroforética das proteínas foi realizada com uma intensidade de corrente constante (35 mA), durante aproximadamente 90 minutos, resultando em valores de voltagem variando entre 90 a 180V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando-se uma amperagem de 150 mA (voltagem ~ 40V) durante 2 horas. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi à seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,1%) e etanol (18%). Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com corante Commassie blue (solução a 0,1% de Commassie *brilliant blue* em solução aquosa de ácido acético 5% contendo 25% de etanol), e as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (0,1% de Pounceau + 5% de ácido Acético). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 0,2% de caseína em tampão TBS-t (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl, pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20) sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15 - 18 horas, a 18°C com anticorpos primários específicos diluídos em tampão TBS-t conforme tabela abaixo. Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 min) com tampão TBS-t

e incubadas com anticorpos secundários conjugados com fosfatase alcalina (AP) ou peroxidase (HRP) diluídos em tampão TBS-t conforme mostrado na tabela abaixo, durante 2 horas. Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas mediante um kit de revelação de quimiluminescência (Lumi-Phos WB para AP e Super Signal para HRP, Pierce, EUA). O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (MW, faixa: 10 a 250 kDa, Bio Rad, CA, E.U.A.).

	Anticorpo primário 1°			Anticorpo secundário 2°
nNOS	250	ng/mL,	polyclonal	1:3000, anti-coelho (cabra) + AP, Bio Rad, CA
3-NT	1000	ng/mL,	monoclonal	1:3000, anti-camundongo (cabra) + AP, Bio Rad, CA
SOD-1	1000	ng/mL, policlonal		1:3000, anti-ovelha (coelho) + HRP, Bio Rad, CA

As imagens foram detectadas em aparelho Chemi Imager (Alpha Innotech Corp., E.U.A.) e as intensidades das bandas foram estimadas por análise densitométrica.

2.12. Preparo das amostras de corpo cavernoso (PCR-Real Time)

Extração de RNA

Para obtenção do RNA dos corpos cavernosos utilizamos o método de extração com o reagente Brazol (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de tecido e Brazol foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos núcleos-protéicos; 200 µl de clorofórmio (CHCl₃) foram adicionados, agitados vigorosamente e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Desprezou-se o sobrenadante e precipitou-se o RNA pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (19.000 g, 10 min a 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 a 4°C), os sobrenadantes foram desprezados, e os tubos foram invertidos e apoiados sobre gazes para eliminar restos de etanol. Posteriormente, o RNA foi dissolvido em água estéril contendo dietilpirocarbonato (DEPC), incubado a 55°C por 10 minutos e colocado em gelo para solubilização total do RNA. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel desnaturante 1,2%. As amostras com qualidade adequada de RNA apresentavam íntegras as duas subunidades ribossomais: 18S e 28S (*Figura 2*). Após a eletroforese, as amostras de RNA foram armazenadas em freezer a -80 °C.

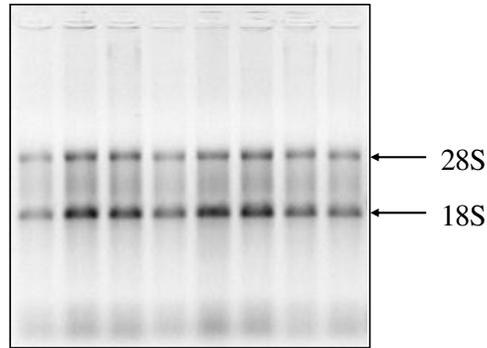


Figura 2. Gel desnaturante com amostras de RNA de corpos cavernosos de rato. As amostras de RNA foram extraídas pela metodologia do Brazol. Notam-se as subunidades 28s e 18S do RNA ribossomal.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA obtidas foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit Superscript III RTTM (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Após leitura e quantificação em espectrofotômetro (NanoDrop, ND 1000), 3 µg de RNA foram tratados com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Para remoção de DNA contaminante, foi adicionado 1,0 µl de 1 U/µl DNase I, 1,0 µl de 10x DNase I *Reaction Buffer* (200 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl₂) e água suficiente para um volume final de 10,0 µl de reação. A reação foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período foi adicionado 1,0 µl de 25 mM EDTA e incubado por 5 minutos à 65° C. Para a síntese do cDNA, foram adicionados 1,0 µl de 50 µM oligo(dT)₂₀ e 1,0 µl de *annealing buffer*. As amostras foram incubadas por 5 minutos à 65° C, seguidos por 1 minuto à 4° C. A cada

amostra adicionamos 10,0 µl de 2x First-Strand Reaction Mix (10 mM MgCl₂ e 1 mM de dNTP) e 2 µl Superscript IIITM/Rnase outTM enzyme mix. As amostras foram aquecidas à 50° C por 50 minutos e à 85° C por 5 minutos e armazenadas à 20° C.

Verificação da síntese de DNA complementar

A verificação da síntese de cDNA foi feita através de PCR para amplificação do gene GAPDH. Realizamos as reações com: 5,0 µl de 10x PCR *buffer* (20 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 µl de 50 mM MgCl₂, 1,0 µl de 10 mM dNTPs, 1,0 µl de 10 mM de *primer* GAPDH-F, 1,0 µl de 10 mM de *primer* GAPDH-, 1,0 µl de Taq DNA *polimerase*, 1,0 µl de cDNA e 39,5 µl de água, para um volume final de 50 µl. O programa foi iniciado por 2 minutos à 94 °C, seguido de 35 ciclos: 94 °C/ 30 segundos – 58 °C/ 45 segundos – 72 °C/ 40 segundos, sendo finalizado por 72 °C/ 7 minutos. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1 % para verificação da qualidade do cDNA.

2.13. Desenho dos primers

Os *primers* utilizados nas reações foram desenhados através de consulta do site www.invitrogen.com e uso do software “Primer Express” (Applied Biosystems), e 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 . Seqüência e tamanho dos fragmentos amplificados de cada par de *primer* utilizado na amplificação dos genes estudados na técnica de PCR quantitativo em tempo real.

<i>Gene</i>	<i>Seqüência Primer</i> 5' → 3'	<i>Tamanho do</i> <i>fragmento</i> <i>amplificado</i>
Gp91phox - F	CATGCTGATCTTGCTGCCAGT	87 pb
Gp91phox -R	TGTCTTCGAATTCTGGTTGAGC	
GAPDH - F	CCTGCCAAGTATGATGACATCAA	72 pb
GAPDH - R	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	

2.14. Padronizações necessárias para o PCR quantitativo em tempo real

Concentração do primer

A concentração ótima de *primer* a ser utilizada na PCR quantitativa em tempo real deve ser a mínima necessária para permitir a duplicação de todas as cópias do gene presentes na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra, foram feitas reações contendo cada um dos *primers* (sense e anti-sense) na concentração final de 150, 300 e 600 nM (considerando que se utilizou a mesma quantidade de amostra em todas as reações, o Ct não deve variar; se o aumento da concentração de *primer* ocasionou diminuição de Ct, então a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente). Assim, a concentração ótima escolhida foi à mínima, associada ao menor Ct.

Eficiência da reação

Para que a reação de PCR em tempo real seja confiável e reprodutiva são necessárias condições ótimas de reação, ou seja, que as amplificações apresentem 100% de eficiência de amplificação a cada ciclo, ocorrendo duplicação da amostra. A eficiência de amplificação é obtida da fórmula $10^{(-1/\text{slope})}$, onde *slope* significa o valor da inclinação da curva (Meijerink *et al*, 2001). A otimização acontece utilizando a concentração ótima de *primer* com 7 quantidades 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 de uma curva padrão Ct *versus* quantidade de amostra. Portanto, após a padronização, determinamos que a concentração ideal dos *primers* fosse de 300 nM, sendo a eficiência de 99,9%.

2.15. PCR quantitativo em Tempo Real – “Real Time PCR”

A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (Higuchi *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou uma molécula intercalante de DNA na fita recém sintetizada. As reações, feitas sempre em duplicata, foram realizadas utilizando o reagente SYBRGreen PCR Master Mix® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTPs, MgCl₂, tampão, Taq Ampli-Gold), contém o corante SYBRGreen, componente intercalante de dupla fita necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo. A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento ABI 5700 Sequence Detector 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 maior o número de cópias no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct. As reações realizadas continham 12,5 µl do reagente SYBRGreen PCR Master Mix®, 10 ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de *primer* determinada, perfazendo um volume final de 25 µl. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Sorenson, BioScience Inc) com tampas plásticas que permitem a passagem de luz. O programa foi iniciado por 95 °C/ 10 minutos, seguido de 45 ciclos: 95 °C/ 15 segundos – 60 °C/ 1 minuto. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de *melting temperature* (TM) entre os produtos de PCR amplificados; essa diferença é causada pelo número e composição de bases de cada produto.

2.16. Análise dos dados do Real Time

A expressão do gene de interesse foi determinada de uma forma relativa, sendo normalizada com relação a genes chamados calibradores. No presente estudo foi utilizado o GAPDH, que é um gene constitutivo, ou seja, apresenta pouca variação entre diversas condições. Dos valores de Ct obtidos, foi calculada média aritmética das duplicatas do Ct. A seguir foi subtraído o valor de Ct do gene de interesse com o valor do controle endógeno da mesma amostra. Em seguida os valores foram normalizados em relação à amostra calibradora ($\Delta\Delta Ct$). O resultado obtido é submetido à fórmula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Os

dados foram expressos como *fold change* da expressão gênica quando comparado à amostra calibradora.

2.17. Análise estatística

Valores experimentais de contração foram calculados em relação à contração máxima produzida pelo KCl (118 mM), e os valores de relaxamento em relação à contração máxima produzida pela fenilefrina (10 μ M), os quais foram tomados como 100%. Valores de EC₅₀ foram apresentados como o logaritmo negativo (pEC₅₀) calculados pelo programa GraphPad Prism. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão das médias. Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Bonferroni*. Teste t pareado de *Student* foi utilizado algumas vezes. O programa InStat (GraphPad Software) foi utilizado para as análises estatísticas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.



3.REUSULTADOS



***3.1. EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA REATIVIDADE DA
MUSCULATURA LISA CAVERNOSA
(Protocolo experimental nº 1)***

3.1.1. *Peso corporal*

A tabela 2 mostra que, ao final do programa de treinamento, os animais treinados (C-TR) apresentaram um menor ganho ponderal ($p < 0,05$), quando comparados aos animais sedentários (C-SD).

Tablela 2. Peso corporal dos grupos controle sedentário (C-SD) e controle treinado (C-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo protocolo experimental nº 1.

<i>Grupos</i>	<i>Peso corporal (g)</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	$\Delta\%$
<i>C-SD</i>	208 ± 6	397 ± 8	91
<i>C-TR</i>	200 ± 3	348 ± 7 *	74 *

Os dados representam as médias ± erro padrão da média para 8-10 ratos.

* $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo C-SD.

3.1.2. Relaxamento de corpo cavernoso induzido pelo SNP e nitrito de sódio acidificado (NaNO₂ acid.)

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito aos doadores de NO, SNP e NaNO₂ acidificado, em corpo cavernoso pré-contraído com fenilefrina (10 μM). A potência (pEC₅₀) do SNP e NaNO₂ acidificado não foram alteradas em nenhum dos grupos analisados (*Figura 3*). Entretanto, o treinamento físico aumentou significativamente a resposta máxima do SNP (C-TR: 95 ± 2%) e NaNO₂ acidificado (C-TR: 88 ± 3%), quando comparados aos grupos controle sedentário (C-SD: 83 ± 3%, 62 ± 4%, respectivamente; *Figura 3*).

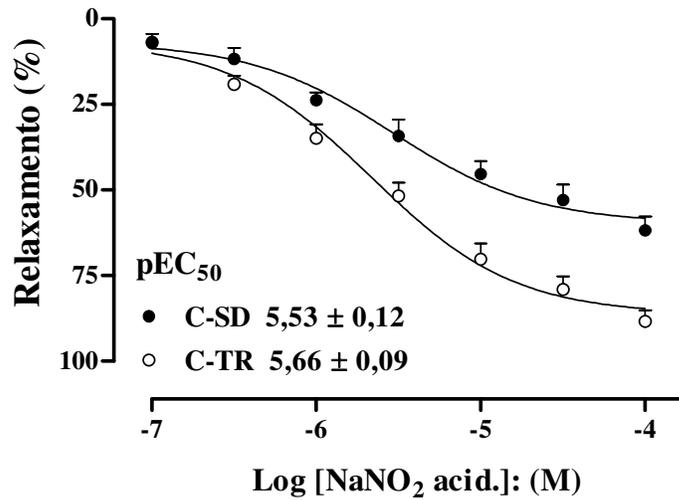
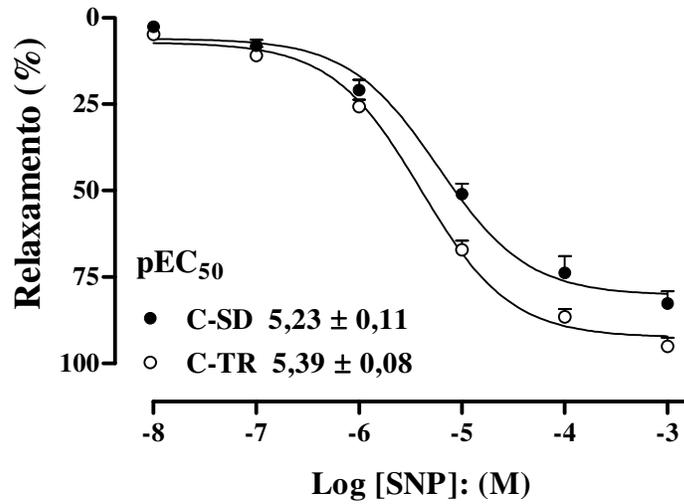


Figura 03. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP; 10 nM – 1 mM) e ao nitrito de sódio acidificado (NaNO₂ acid; 100 nM – 100 μM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD) e controle treinado (C-TR). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 4-6 experimentos. **p* < 0,05 comparado com o grupo C-SD. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos no interior de cada painel.

3.1.3. Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina

O relaxamento dependente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito à acetilcolina (10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). Nem a potência (pEC_{50}), nem a resposta máxima da acetilcolina foi alterada pelo treinamento físico (C-SD: 26 ± 2 ; C-TR: 31 ± 2 ; *Figura 4*).

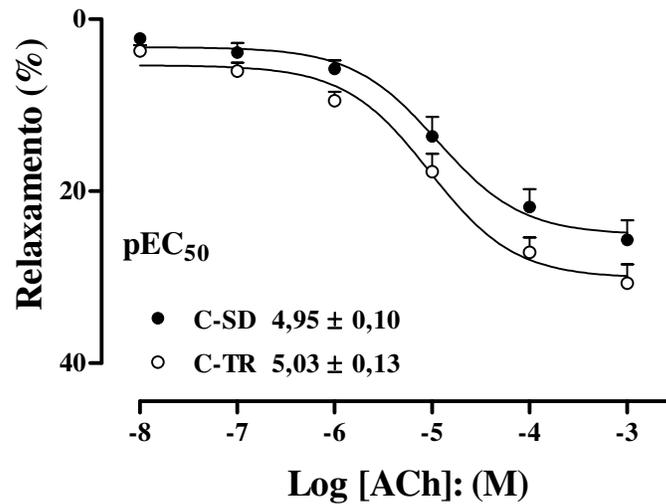


Figura 04. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (10 nM - 1mM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD) e controle treinado (C-TR). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos no interior do painel.

3.1.4. Contração de corpo cavernoso de ratos induzida pela fenilefrina e ET-1

A contração foi avaliada através da construção de curvas concentração-efeito à fenilefrina (10 nM – 100 μ M) e ET-1 (10 pM – 100 nM) em corpos cavernosos de ratos. Nem as potências (pEC₅₀) nem as respostas máximas para ambos os agentes contráteis foram alteradas pelo treinamento físico (*Figura 5*).

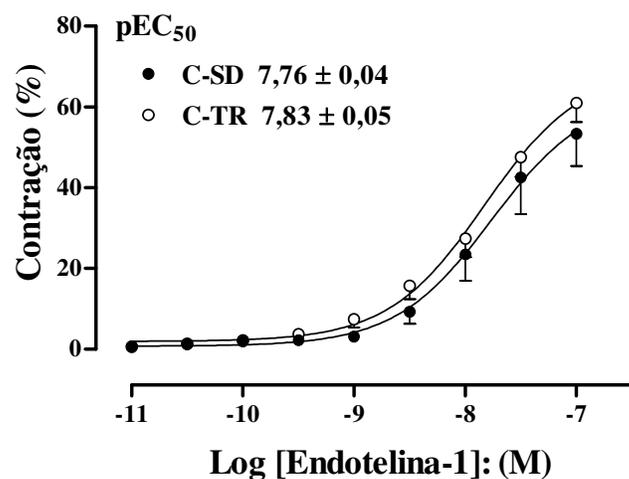
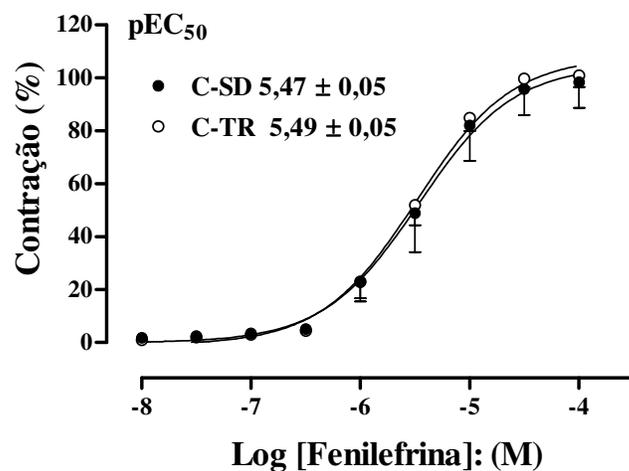


Figura 05. Curvas concentração-efeito à fenilefrina (10 nM – 100 µM) e endotelina-1 (1 pM – 100 nM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD) e controle treinado (C-TR). A contração foi calculada como porcentagem da contração induzida pelo KCl (118 mM), que foi tomado como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-9 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos no interior de cada painel.

3.1.5. Contração e relaxamento induzido pela estimulação elétrica (EFS)

A resposta neurogênica foi analisada pela estimulação elétrica avaliando as respostas relaxantes e contráteis das preparações de corpos cavernosos de ratos, através da construção de curvas frequência-efeito (2-32 Hz). A estimulação elétrica da preparação produziu contração frequência-dependente nos animais sedentários, que não foram modificadas pelo treinamento físico (*Figura 6A*).

O relaxamento neurogênico foi avaliado em tecidos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). A estimulação elétrica da preparação induziu relaxamento frequência-dependente nos animais sedentários. O treinamento físico aumentou significativamente o relaxamento nas frequências de 2 e 4 Hz, comparado com as respectivas frequências no grupo C-SD (*Figura 6B*).

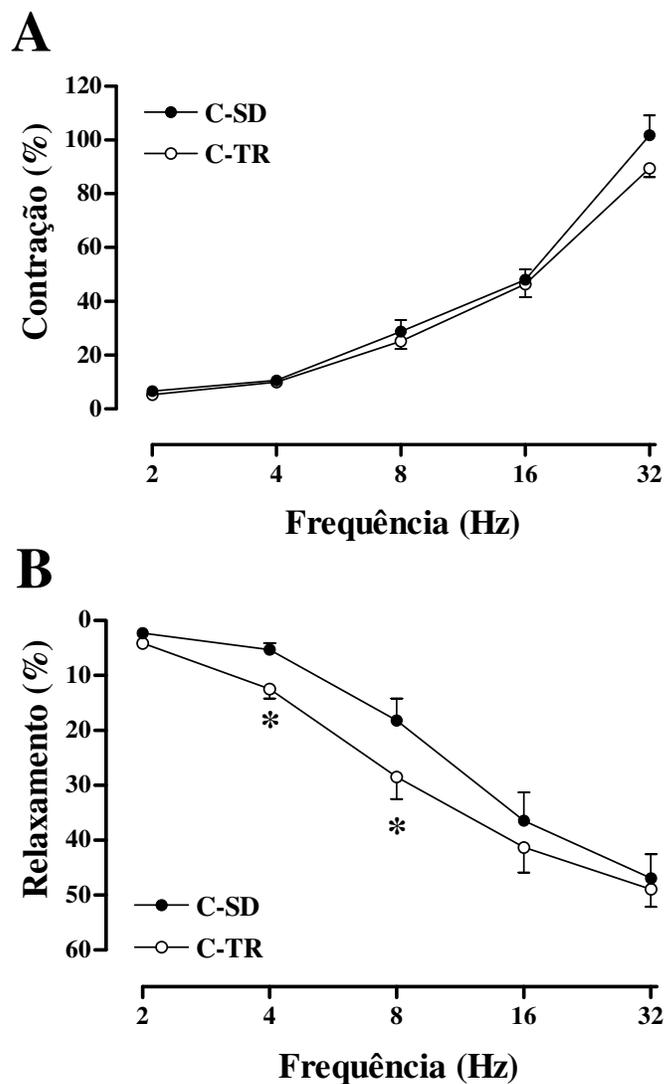


Figura 06. Contração (painel A) e relaxamento (painel B) de corpo cavernoso de rato induzido por estimulação elétrica (2 – 32 Hz) em animais controle sedentário (C-SD) e controle treinado (C-TR). Para a resposta contrátil, tomou-se a contração do KCl (118 mM) como 100%, ao passo que para a resposta relaxante, tomou-se a pré-contração pela fenilefrina (10 μ M) como 100%, como descrito em Métodos. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 4-6 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C-SD.

3.2. EFEITO DO PRÉ-CONDICIONAMENTO FÍSICO NA FUNÇÃO

ERÉTIL DE RATOS DEFICIENTES CRÔNICOS DE NO

(Protocolo experimental nº 2)

3.2.1. *Peso corporal*

A tabela 3 mostra que, ao final do protocolo experimental, os animais sedentários (C-SD e LN-SD) apresentaram um maior ganho ponderal ($p < 0,05$) quando comparados com os respectivos grupos treinados (C-TR e LN-TR), independentemente de terem sido tratados ou não com L-NAME. Entre os grupos treinados, não houve diferenças significativas. Entre os grupos sedentários, também não houve diferenças significativas, quando comparado com os demais grupos de animais sedentários (*Tabela 3*).

Tabela 3. Peso corporal dos grupos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo o protocolo experimental n° 2.

<i>Peso corporal (g)</i>			
<i>Grupos</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	Δ %
<i>C-SD</i>	204 \pm 6	402 \pm 8	97
<i>C-TR</i>	202 \pm 5	359 \pm 7*	78*
<i>LN-SD (2 mg)</i>	195 \pm 4	414 \pm 4	112
<i>LN-TR (2 mg)</i>	199 \pm 3	367 \pm 6* #	84* #
<i>LN-SD (10 mg)</i>	200 \pm 2	411 \pm 8	120
<i>LN-TR (10 mg)</i>	203 \pm 3	357 \pm 7* #	75* #

Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 10-16 ratos.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo C-SD; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LN-SD (2 e 10 mg).

3.2.2. Pressão arterial sistólica

A tabela 4 mostra que a adição de L-NAME à dieta hídrica, nas doses de 2 e 10 mg/rato/dia, elevou em 19% e 40%, respectivamente, a pressão arterial dos ratos LN-SD. O treinamento físico atenuou significativamente a hipertensão arterial induzida pelo L-NAME (LN-TR), tanto nas doses de 2 quanto de 10 mg/rato/dia. O treinamento físico (C-TR), individualmente, não modificou significativamente a pressão arterial dos ratos sedentários (C-SD).

Tabela 4. Pressão arterial sistólica dos grupos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas seguindo o protocolo experimental n° 2.

<i>Pressão arterial sistólica (mmHg)</i>			
<i>Grupos</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	Δ %
<i>C-SD</i>	126 ± 1	128 ± 1	1
<i>C-TR</i>	127 ± 2	132 ± 2	4
<i>LN-SD (2 mg)</i>	129 ± 2	154 ± 1*	19*
<i>LN-TR (2 mg)</i>	126 ± 1	135 ± 2 [#]	7 [#]
<i>LN-SD (10 mg)</i>	125 ± 1	175 ± 2*	40*
<i>LN-TR (10 mg)</i>	126 ± 2	141 ± 2 [#]	12 [#]

O dado representa as médias ± erro padrão da média para 8-10 experimentos.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo C-SD; [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo LN-SD (2 e 10 mg).

3.2.3. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo SNP

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao SNP (10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos pré-contráídos com fenilefrina (10 μ M). A potência (pEC_{50}) do SNP não foi afetada pelo treinamento e/ou tratamento com 2 mg/rato/dia de L-NAME (*Figura 7A*). Entretanto, a resposta máxima ao SNP aumentou nos grupos submetidos ao treinamento (C-TR: $98 \pm 1\%$; LN-TR: $95 \pm 1\%$), comparados com os grupos C-SD ($89 \pm 1\%$) e LN-SD ($88 \pm 3\%$ - *Figura 7A*). Resultados semelhantes foram observados no grupo de animais tratados com 10 mg/rato/dia de L-NAME (*Figura 7B*), onde a pEC_{50} não foi afetada pelo treinamento e/ou tratamento com L-NAME, mas a resposta máxima foi discretamente (mas significante) elevada.

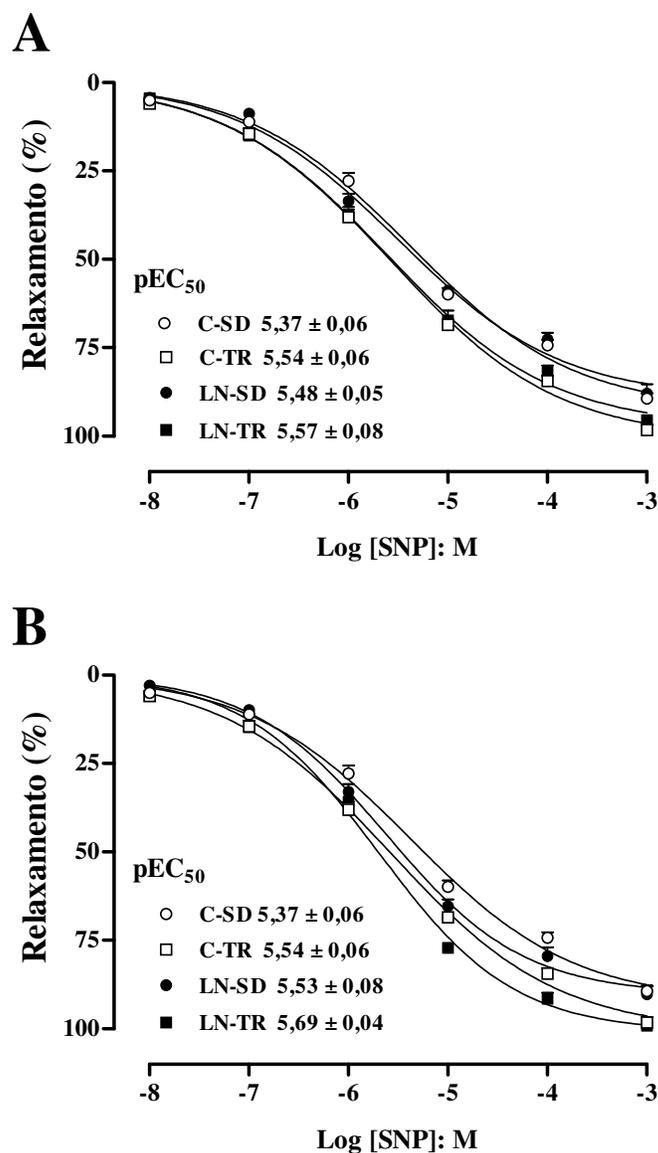


Figura 07. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP; 10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os ratos foram tratados com L-NAME nas concentrações de 2 mg/rato/dia (painel A) ou 10 mg/rato/dia (painel 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 6-8 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C-SD; # $p < 0,05$ comparado com o grupo LN-SD. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos no interior de cada painel.

3.2.4. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina

O relaxamento dependente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito à acetilcolina (10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 μM). No grupo de animais tratados com 2mg/rato/dia de L-NAME, a potência (pEC₅₀) da acetilcolina não foi alterada em animais submetidos ao treinamento e/ou tratamento (*Figura 8A*). No entanto, o treinamento físico promoveu aumento discreto, porém significativo da resposta máxima à acetilcolina em relação aos grupos de ratos sedentários (*Figura 8A*).

No grupo de ratos submetidos ao tratamento com 10 mg/rato/dia de L-NAME (*Figura 8B*), a potência da acetilcolina em corpo cavernoso não foi alterada nos animais submetidos ao treinamento (C-TR), comparada ao grupo C-SD. Entretanto, nesta dose de L-NAME, houve redução significativa da potência da acetilcolina nos animais sedentários (LN-SD) como treinados (LN-TR; *Figura 8B*). A resposta máxima à acetilcolina foi reduzida nos animais sedentários submetidos a esta dose de L-NAME (LN-SD), comparada aos grupos C-SD. Esta redução foi significativamente revertida pelo treinamento físico (grupo LN-TR; *Figura 8B*).

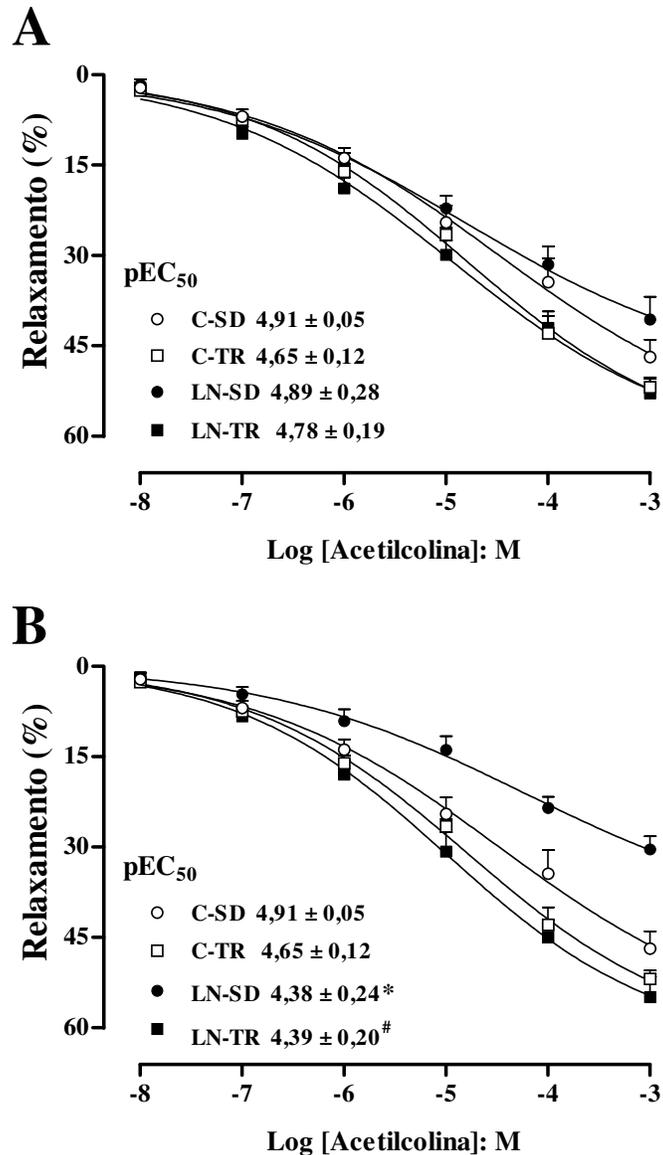


Figura 08. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os ratos foram tratados com L-NAME nas concentrações de 2 mg/rato/dia (painel A) ou 10 mg/rato/dia (painel B). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 µM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 5-7 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C-SD; [#] $p < 0,05$ comparado com o grupo LN-SD. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos no interior de cada painel.

3.2.5. Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pelo BAY 41-2272

O relaxamento mediado pelo estimulador direto da GCs por mecanismo independente de NO foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao BAY 41-2272 (1 nM – 10 µM) em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 µM). Nem a potência (*Figura 9A*), nem a resposta máxima do BAY 41-2272 (*Figura 9A*) foi alterada pelo treinamento e/ou tratamento crônico com L-NAME na dose de 2 mg/rato/dia.

De modo similar, nem a potência nem a resposta máxima do BAY 41-2272 foi alterada pelo treinamento e/ou tratamento crônico com 10 mg/rato/dia de L-NAME (*Figura 9B*).

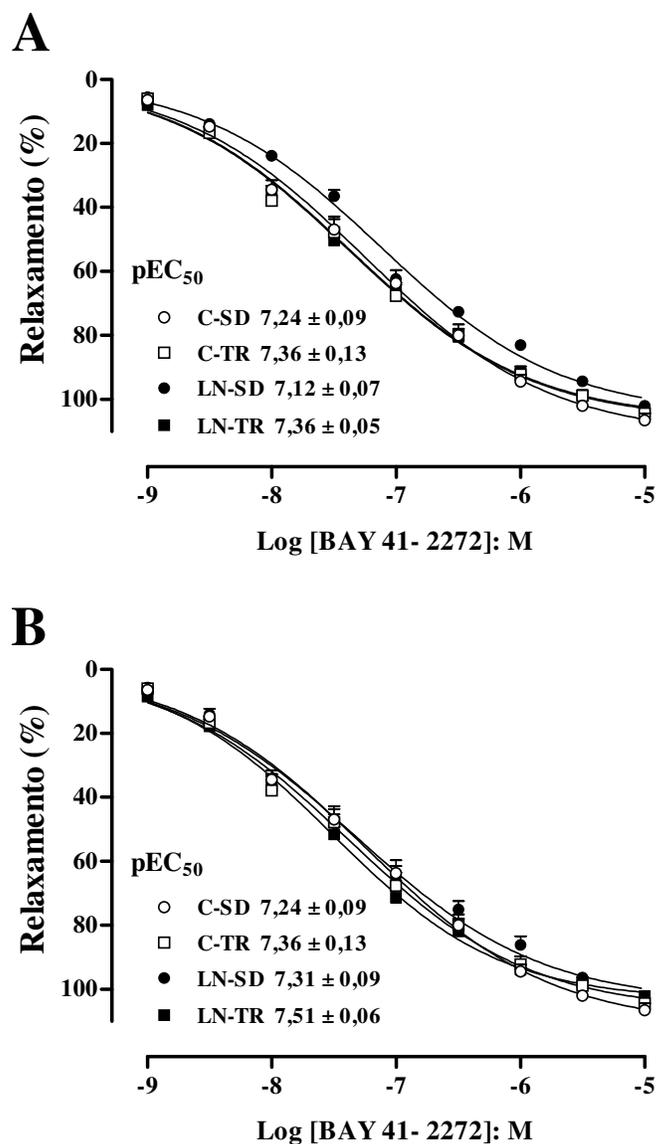


Figura 09. Curvas concentração-efeito ao BAY 41-2272 (1 nM – 10 µM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os ratos foram tratados com L-NAME nas concentrações de 2 mg/rato/dia (painel A) ou 10 mg/rato/dia (painel B). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 µM), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 5-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos no interior de cada painel.

3.2.6. Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pelo sildenafil

O relaxamento produzido pelo inibidor seletivo da PDE5 foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao sildenafil (1 nM – 10 μ M) em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). Nem a potência, nem a resposta máxima ao sildenafil foi afetada pelo treinamento e/ou tratamento com L-NAME na dose de 2 mg/rato/dia (*Figura 10A*).

Resultados semelhantes foram obtidos no grupo de ratos tratados com L-NAME 10 mg/rato/dia, onde nem a potência nem a resposta máxima ao sildenafil foi afetada pelo treinamento e/ou tratamento com L-NAME (*Figura 10B*).

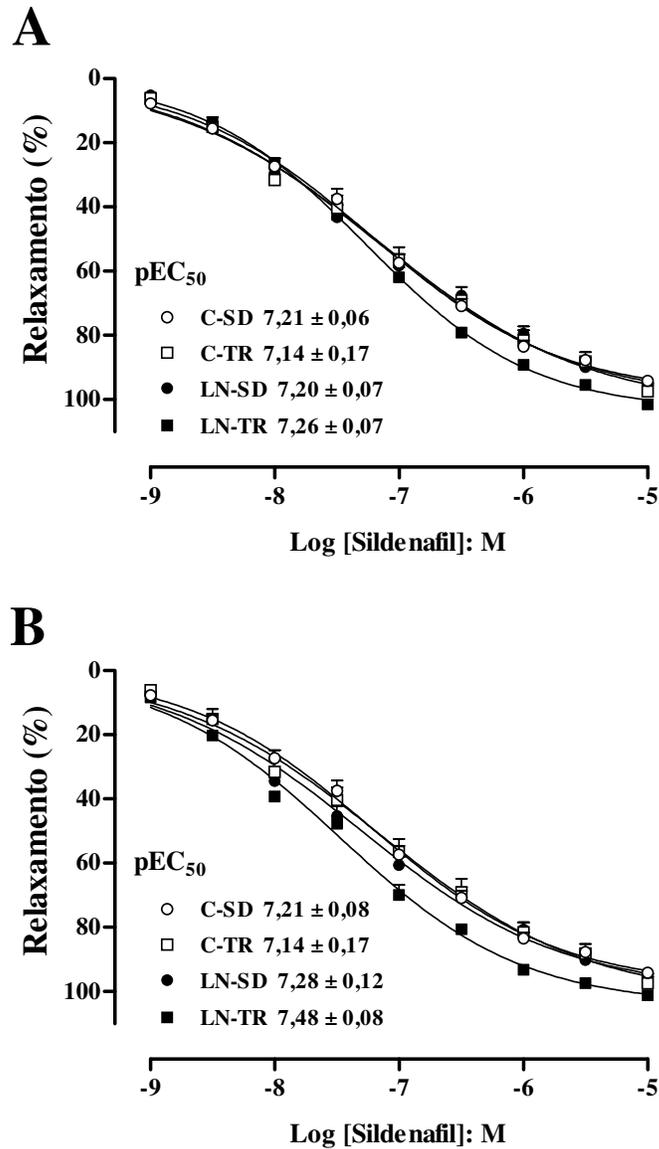


Figura 10. Curvas concentração-efeito ao sildenafil (1 nM - 10 μ M) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os ratos foram tratados com L-NAME nas concentrações de 2 mg/rato/dia (painel A) ou 10 mg/rato/dia (painel 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 5-8 experimentos. Os valores de potência (pEC₅₀) estão inseridos no interior de cada painel.

3.2.7. Relaxamento de corpo cavernoso de ratos induzido pela EFS

O relaxamento evocado pela estimulação elétrica das preparações de corpo cavernoso foi avaliado através da construção de curvas crescentes de frequências (2, 4, 8, 16, 32 Hz) em tecidos pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). A estimulação elétrica da preparação produziu relaxamento dependente da frequência nos animais sedentários (C-SD - *Figura 11A*), sendo este efeito reduzido, porém não significativamente nos animais tratados com 2 mg/rato/dia de L-NAME (LN-SD). O treinamento físico (C-TR) aumentou significativamente o relaxamento, comparado aos animais C-SD nas frequências de 8, 16 e 32 Hz, e atenuou a inibição produzida pelo L-NAME (LN-TR). No grupo de animais tratados com 10 mg/rato/dia de L-NAME (LN-SD), notamos também redução marcante e significativa do relaxamento nas frequências de 8 a 32 Hz em relação ao grupo controle sedentário (C-SD - *Figura 11B*). O treinamento físico (C-TR) promoveu um aumento significativo do relaxamento frequência-dependente, comparado ao grupo C-SD. Além disso, o treinamento físico reverteu significativamente à inibição do relaxamento causada pelo L-NAME (LN-TR – *Figura 11B*).

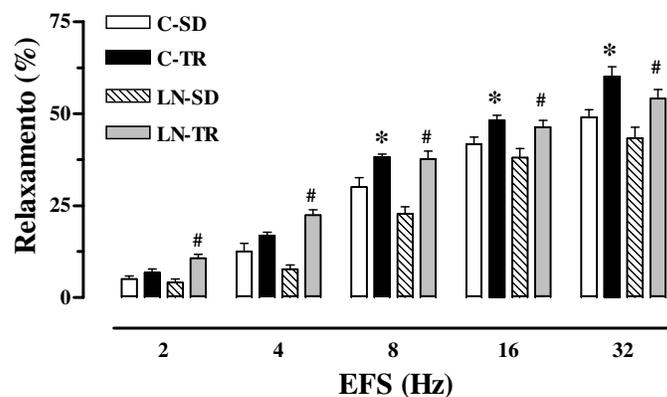
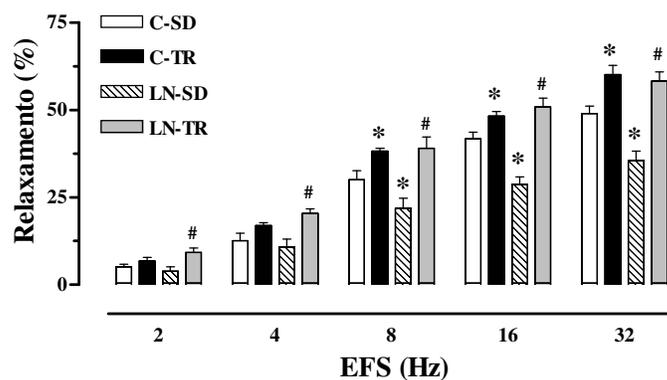
A**B**

Figura 11. Relaxamento de corpo cavernoso induzido por estimulação elétrica (EFS) em animais controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os ratos foram tratados com L-NAME nas concentrações de 2 mg/rato/dia (painel A) ou 10 mg/rato/dia (painel 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 7-9 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C-SD; # $p < 0,05$ comparado com o grupo LN-SD.

3.2.8. Medidas de pressão intracavernosa “in vivo”

O treinamento físico (C-TR) aumentou significativamente a razão ICP/MAP nas maiores frequências (6, 8 e 10 Hz) comparado ao grupo controle sedentário (C-SD). O tratamento com L-NAME reduziu significativamente a razão ICP/MAP dos animais comparado ao grupo C-SD em todas as frequências utilizadas. Entretanto, apesar de se notar uma tendência de “melhora” da ICP/MAP pelo treinamento no grupo L-NAME (LN-TR) em todas as frequências, a análise estatística não mostrou diferenças entre os grupos LN-SD e LN-TR (*Figura 12A*).

A *figura 12B* mostra que o treinamento físico aumentou significativamente a AUC nas maiores frequências utilizadas (6, 8 e 10 Hz), comparada ao grupo controle sedentário (C-SD). O tratamento com L-NAME reduziu significativamente a AUC dos animais comparado ao grupo C-SD, particularmente nas frequências de 4 e 6 Hz. O treinamento físico (LN-TR) reverteu significativamente a redução da AUC proporcionada pelo L-NAME (*Figura 12B*).

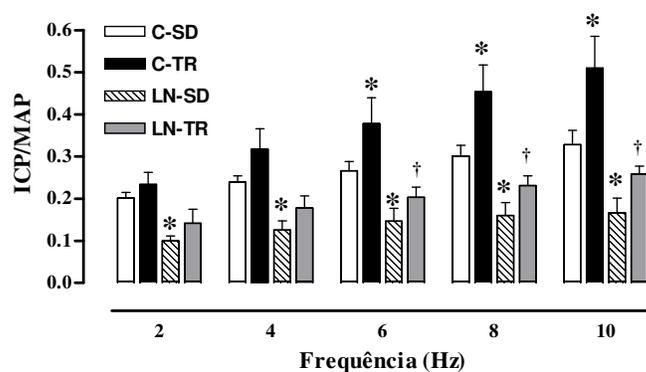
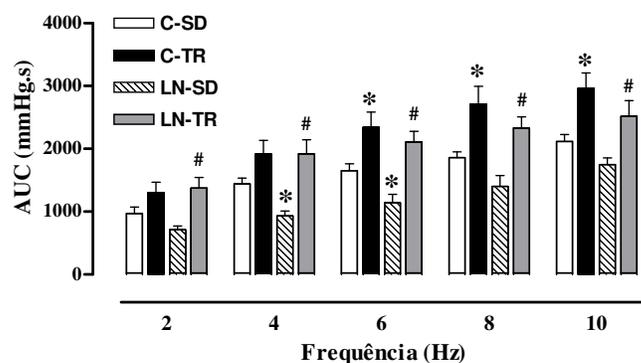
A**B**

Figura 12. Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso de ratos grupos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores da razão pressão intracavernosa dividida pela pressão arterial média (ICP/MAP; painel A) e área sobre a curva (AUC – painel B). Os ratos foram tratados com L-NAME na concentração de 10 mg/rato/dia. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de n experimentos. * $p < 0.05$ comparado ao grupo C-SD; # $p < 0.05$ comparado ao grupo LN-SD; † $p < 0.05$ comparado ao grupo C-TR.

3.2.9. Níveis plasmáticos de NOx

O treinamento físico aumentou significativamente os níveis plasmáticos de NOx (C-TR), quando comparado ao grupo controle sedentário (C-SD). Os animais submetidos ao tratamento crônico com L-NAME apresentaram redução significativa dos níveis plasmáticos de NOx (LN-SD), quando comparados ao grupo C-SD. Esta redução causada pelo L-NAME foi significativamente revertida pelo treinamento físico (LN-TR - *Figura 13*).

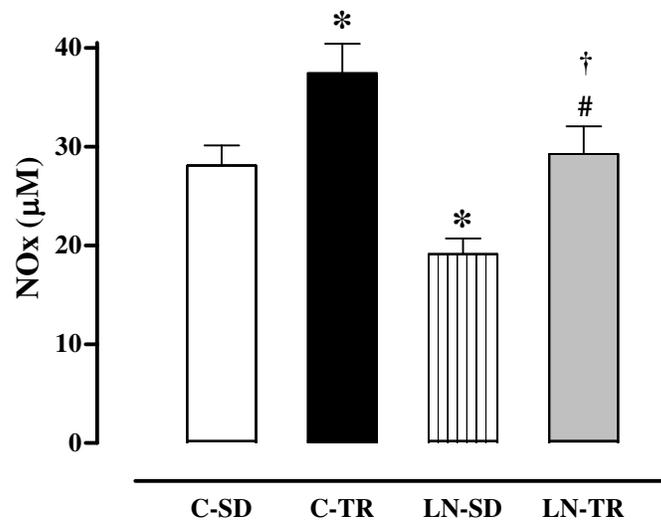


Figura 13. Concentração plasmática de nitrito/nitrato (NOx) em animais controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR), submetidos ao programa de treinamento. Os ratos foram tratados com L-NAME na concentração de 10 mg/rato/dia. Os dados representam as médias \pm E.P.M. para n experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao grupo C-SD; # $p < 0,05$ comparado ao grupo LN-SD; † $p < 0,05$ comparado ao grupo C-TR.

***3.2. EFEITO DO PÓS-TREINAMENTO NA FUNÇÃO ERÉTIL DE
RATOS DEFICIENTES CRÔNICOS DE NO
(Protocolo experimental nº 3)***

3.3.1. *Peso corporal*

A tabela 5 mostra que, ao final do protocolo experimental, os animais sedentários (C-SD e LN-SD) apresentaram um maior ganho ponderal ($p < 0,05$) quando comparados aos animais treinados (C-TR e LN-TR), independentemente de terem sido tratados ou não com L-NAME. Entre os grupos treinados, não houve diferenças significativas. Igualmente, entre os grupos sedentários (C-SD e LN-SD), não houve diferenças significativas do peso corpóreo.

Tabela 5. Peso corporal dos ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo o protocolo experimental nº 3.

<i>Peso corporal (g)</i>			
<i>Grupos</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	Δ %
<i>C-SD</i>	206 \pm 10	395 \pm 4	92
<i>C-TR</i>	200 \pm 4	357 \pm 9 *	78*
<i>LN-SD (10 mg)</i>	202 \pm 7	427 \pm 10	112
<i>LN-TR (10 mg)</i>	201 \pm 7	359 \pm 9 #	79 #

Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 12-15 ratos.

* $p < 0.05$ comparado ao grupo C-SD; # $p < 0.05$ comparado ao grupo LN-SD.

3.3.2. Pressão arterial sistólica

A tabela 6 mostra que o L-NAME, na dose de 10 mg/rato/dia, elevou em 57% a pressão arterial dos animais sedentários (LN-SD). O treinamento físico atenuou significativamente a hipertensão arterial induzida pelo L-NAME (LN-TR). O treinamento físico (C-TR), individualmente, não modificou significativamente a pressão arterial dos ratos sedentários (C-SD).

Tabela 6. Pressão arterial sistólica dos ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Valores iniciais e após 8 semanas, seguindo o protocolo experimental nº 3.

<i>Pressão arterial sistólica (mmHg)</i>			
<i>Grupos</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	Δ %
<i>C-SD</i>	127 \pm 1	129 \pm 2	2
<i>C-TR</i>	126 \pm 2	128 \pm 3	1
<i>LN-SD (10 mg)</i>	124 \pm 1	195 \pm 4 *	57 *
<i>LN-TR (10 mg)</i>	125 \pm 2	170 \pm 5 #†	36 #†

Os dados representam as médias \pm erro padrão da média para 8-10 ratos.

* $p < 0.05$ comparado ao grupo C-SD; # $p < 0.05$ comparado ao grupo LN-SD; † $p < 0.05$ comparado ao grupo C-TR.

3.3.3. Relaxamento de corpo cavernoso de ratos mediado pelo SNP

A potência (pEC_{50}) do SNP em corpo cavernoso de ratos não foi afetada pelo treinamento e/ou tratamento com 10 mg/rato/dia de L-NAME (*Figura 14*). Entretanto, a resposta máxima ao SNP aumentou significativamente nos grupos submetidos ao treinamento (C-TR: $98 \pm 2\%$ e LN-TR: $97 \pm 2\%$), comparado com os grupos sedentários (C-SD: $89 \pm 1\%$ e LN-SD: $88 \pm 3\%$; respectivamente - *Figura 14*).

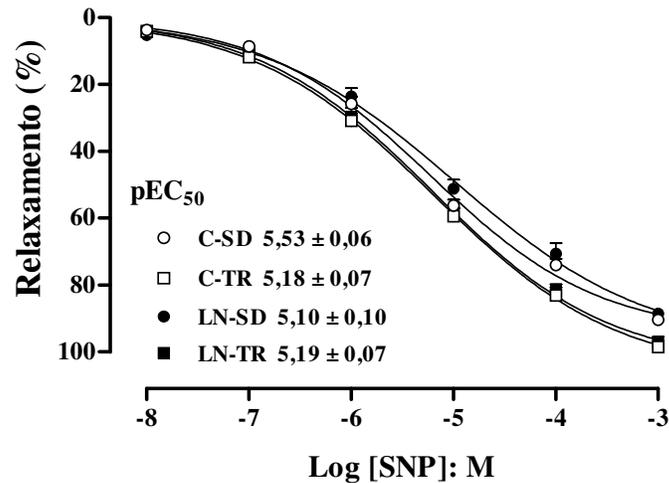


Figura 14. Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP; 10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 6-8 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos no interior do painel.

3.3.4. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina

A potência (pEC_{50}) da acetilcolina em corpo cavernoso não foi alterada nos animais submetidos ao treinamento (C-TR), comparada ao grupo controle sedentário (C-SD). O tratamento crônico com L-NAME, na dose de 10 mg/rato/dia, promoveu redução significativa da potência da acetilcolina em animais sedentários e treinados (LN-SD e LN-TR) comparado ao grupo C-SD (Figura 15). A resposta máxima à acetilcolina foi reduzida pelo tratamento com L-NAME nos animais sedentários (LN-SD: $31 \pm 2\%$), comparada ao grupo C-SD ($47 \pm 3\%$). A redução causada pelo L-NAME foi atenuada significativamente pelo treinamento físico (LN-TR: $46 \pm 2\%$ - Figura 15).

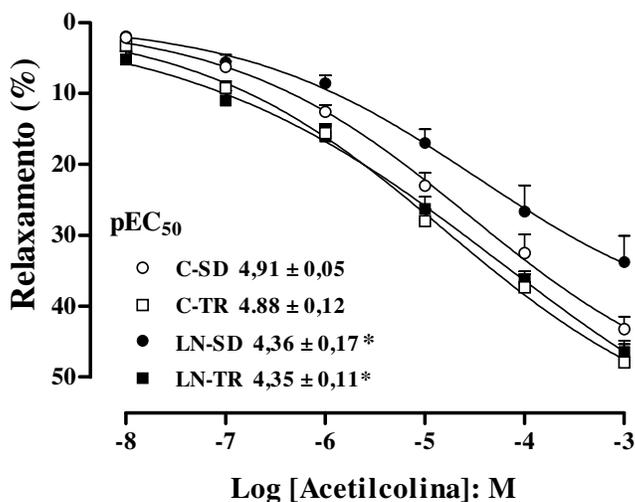


Figura 15. Curvas concentração-efeito à acetilcolina (10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 7-8 experimentos. Os valores de potência (pEC_{50}) estão inseridos no interior do painel. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C-SD.

3.3.5. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela EFS

A figura 16 mostra que a estimulação elétrica da preparação produziu relaxamento dependente da frequência nos animais sedentários (C-SD), sendo este efeito significativamente reduzido nos animais tratados com 10 mg/rato/dia de L-NAME (LN-SD) para as maiores frequências (8, 16 e 32 Hz). Essa redução promovida pelo L-NAME foi significativamente revertida pelo treinamento físico (LN-TR; Figura 16).

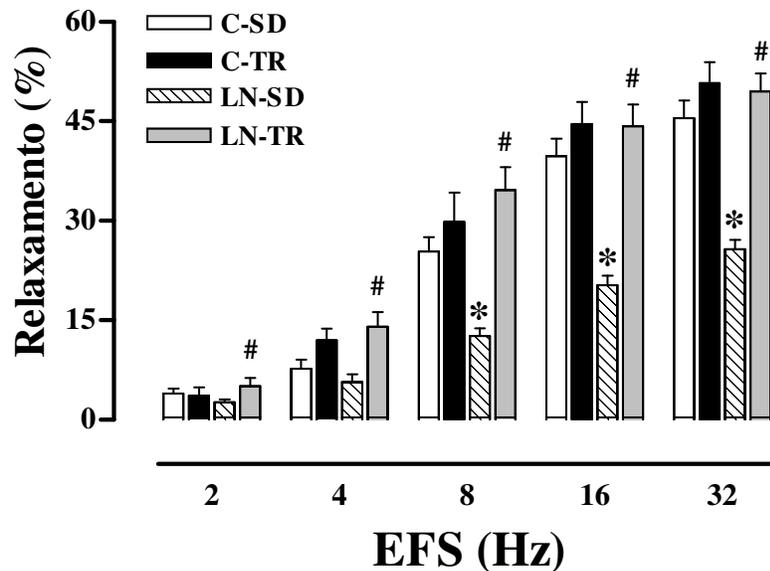


Figura 16. Relaxamento de corpo cavernoso induzido por estimulação elétrica (EFS) em animais controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 6-8 experimentos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo C-SD; # $p < 0,05$ comparado com o grupo LN-SD.

3.3.6. Medidas de pressão intracavernosa “in vivo”

O treinamento físico não alterou significativamente a razão ICP/MAP (C-TR) comparado ao grupo controle sedentário (C-SD) em nenhuma das freqüências utilizadas. O tratamento com L-NAME (LN-SD) reduziu significativamente a ICP/MAP dos animais comparado ao grupo C-SD. Entretanto, o treinamento físico (LN-TR) reverteu significativamente a redução da razão ICP/MAP proporcionada pelo tratamento com L-NAME (*Figura 17A*).

Em relação a AUC, o treinamento físico não alterou a AUC (C-TR) comparado ao grupo controle sedentário (C-SD). O tratamento com L-NAME reduziu significativamente a AUC dos animais comparado ao grupo C-SD. Entretanto, o treinamento físico (LN-TR) reverteu significativamente a redução da AUC proporcionada pelo L-NAME (*Figura 17B*).

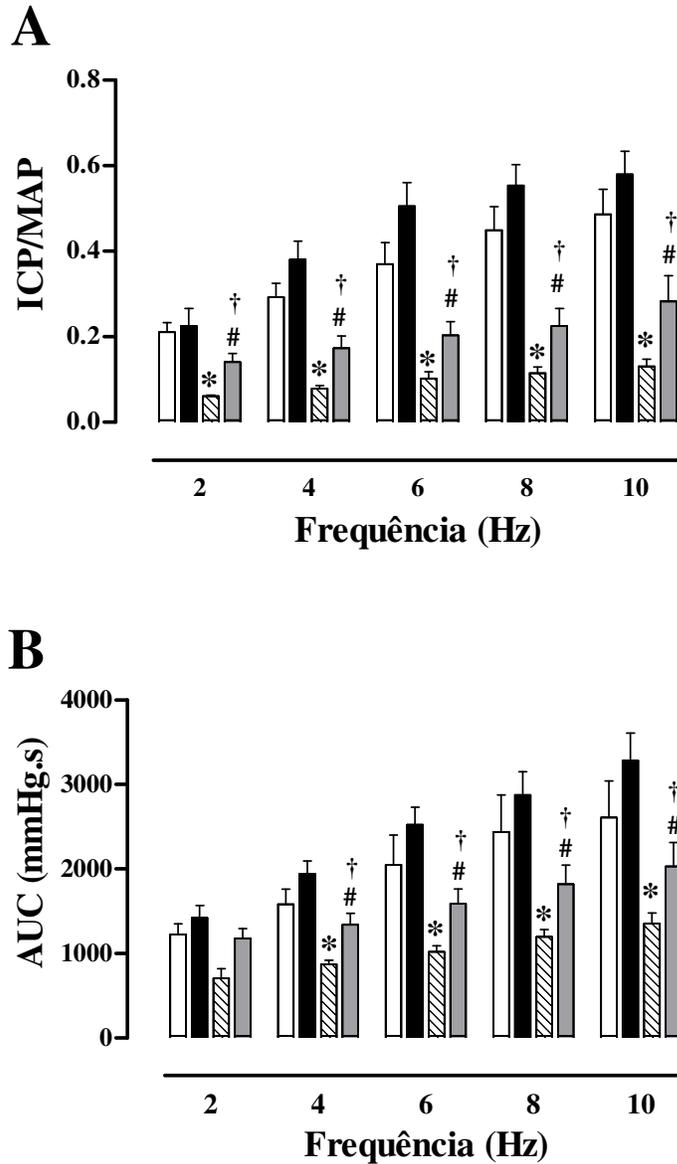


Figura 17. Avaliação da resposta erétil pela estimulação do nervo cavernoso de ratos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). O painel A mostra a razão ICP/MAP, ao passo que o painel B mostra a AUC. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 4 – 8 experimentos. * $p < 0.05$ comparado ao grupo C-SD; # $p < 0.05$ comparado ao grupo LN-SD; † $p < 0.05$ comparado ao grupo C-TR.

3.3.7. Níveis plasmáticos de NOx

A atividade física não promoveu alteração dos níveis plasmáticos de NOx (C-TR), quando comparado ao grupo controle sedentário (C-SD). No entanto, os animais submetidos ao tratamento crônico com L-NAME (LN-SD) apresentaram redução significativa dos níveis plasmáticos de NOx quando comparados com o grupo C-SD. O treinamento físico atenuou a redução induzida pelo tratamento com L-NAME (LN-TR - *Figura 18*).

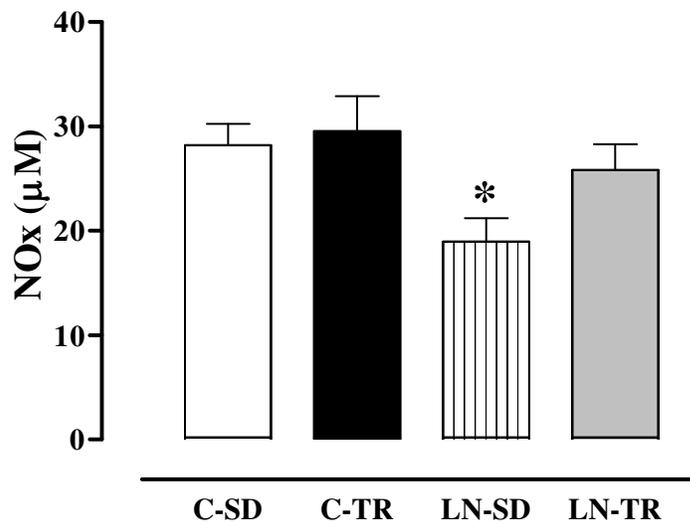


Figura 18. Concentração plasmática de nitrito/nitrato (NOx) em animais controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para n experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao grupo C-SD.

3.3.8. Expressão protéica da nNOS e PnNOS

Os animais treinados (C-TR e LN-TR) não mostraram alteração da expressão protéica das isoformas nNOS e PnNOS comparado aos grupos sedentários (C-SD e LN-SD; *Figura 19*).

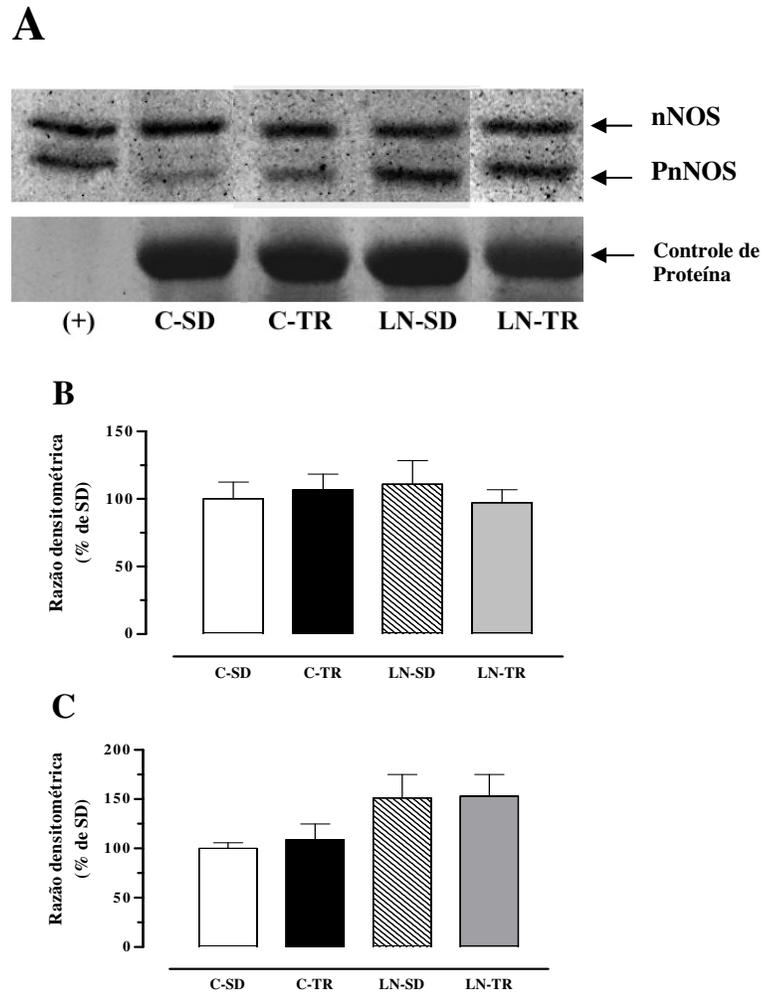


Figura 19. Expressão protéica da nNOS e PnNOS em corpo cavernoso de animais controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). *Western blotting* representativo para nNOS e PnNOS (painel A), densitometria para nNOS (painel B) e PnNOS (painel C). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 8 experimentos.

3.3.9. Expressão protéica do resíduo da nitrotirosina

A expressão protéica do resíduo da nitrotirosina (proteínas de 60 e 92 kDa) foi realizada em corpo cavernoso de ratos tratados com L-NAME, submetidos ou não ao treinamento físico. Os animais treinados (C-TR) não apresentaram alterações da expressão da proteína de 60 kDa comparado com o grupo C-SD. Os animais submetidos ao tratamento com L-NAME (LN-SD) apresentaram um discreto aumento na expressão da proteína de 60 kDa; porém este aumento não foi estatisticamente significativo (*Figura 20A e C*).

Avaliando a expressão da proteína de 92 kDa, verificamos um aumento significativo no grupo L-NAME (LN-SD), comparado com o grupo C-SD. Além disso, o treinamento físico reverteu o aumento da expressão desta proteína observado nos animais submetidos ao tratamento crônico com L-NAME (*Figura 20A e B*).

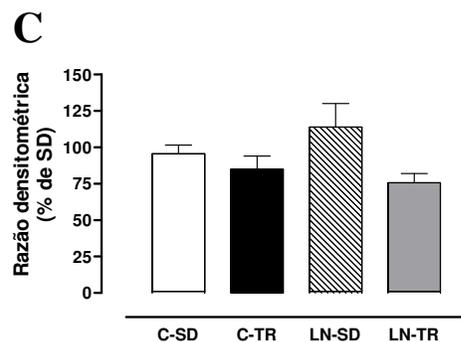
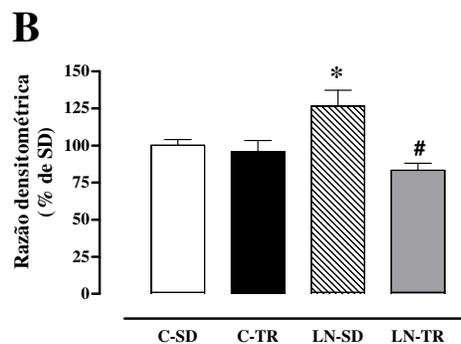
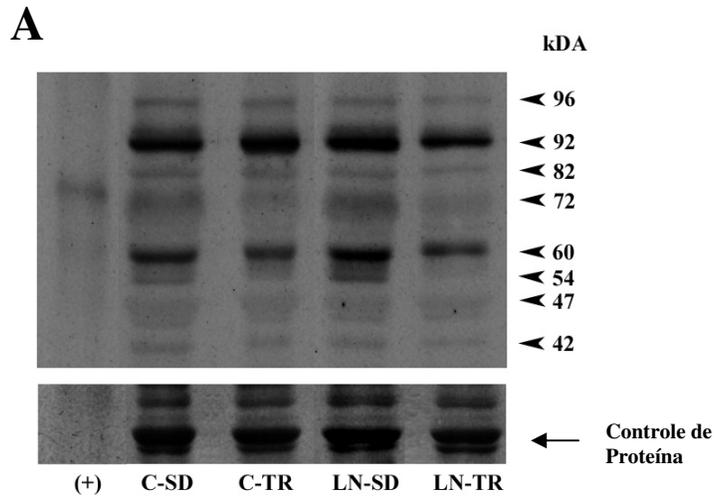


Figura 20. Expressão protéica da nitrotirosina em corpo cavernoso de animais controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). O painel A ilustra o *Western blotting* representativo para nitrotirosina. Os painéis B e C ilustram a densitometria para proteína de 92 kDA e 60 kDA, respectivamente. Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 8 experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao grupo C-SD; # $p < 0,05$ comparado com o grupo LN-SD

3.3.10. Expressão protéica da SOD

Os animais treinados (C-TR e LN-TR), independentemente do tratamento crônico com L-NAME, não mostraram alteração da expressão protéica da SOD-1 ou CuZnSOD, comparado aos respectivos controles (C-SD e LN-SD) (*Figura 21*).

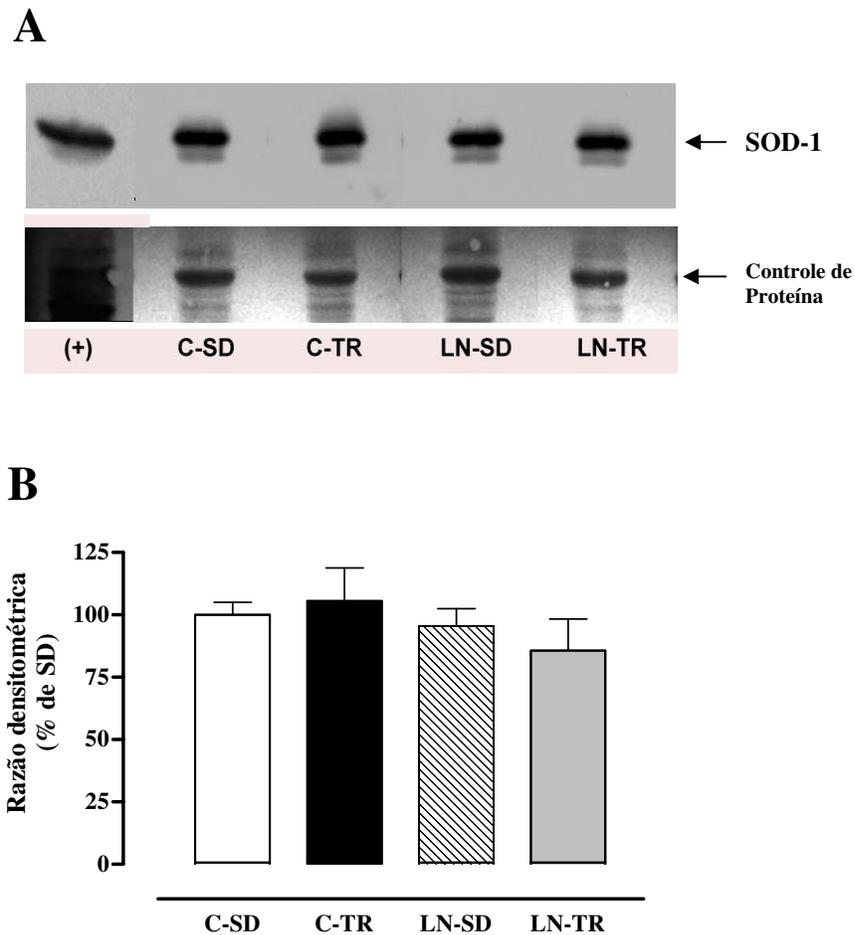


Figura 21. Expressão protéica da superóxido dismutase SOD-1 ou CuZnSOD em corpo cavernoso de animais controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). *Western blotting* representativo para SOD-1 (painel A) e densitometria para SOD-1 (painel B). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 8 experimentos.

3.3.11. Atividade plasmática da SOD

A atividade da SOD foi medida em plasma de animais controle-sedentário (C-SD), controle-treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). O treinamento físico (C-TR) não promoveu alteração na atividade da SOD, quando comparado ao grupo C-SD. No entanto, o tratamento crônico com L-NAME (LN-SD) reduziu significativamente (34%) a atividade plasmática da SOD, comparada aos animais C-SD. Esta redução de atividade da SOD foi atenuada (24%) pelo treinamento físico (LN-TR; *Figura 22*).

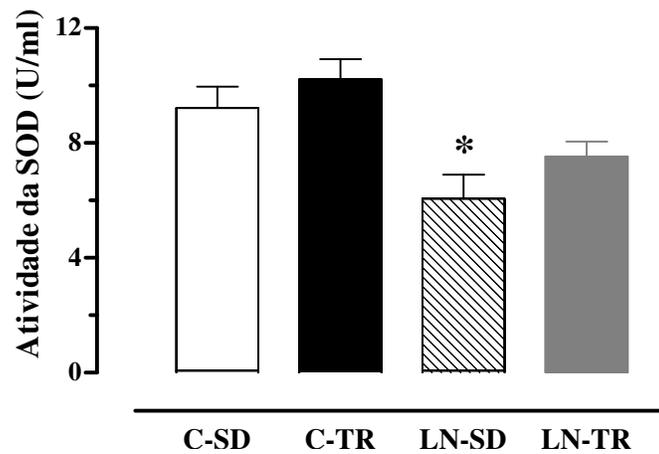


Figura 22. Atividade plasmática da superóxido dismutase (SOD) em animais controle-sedentário (C-SD), controle-treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 6-9 experimentos. * $p < 0,05$, comparado ao grupo C-SD.

3.3.12. Expressão gênica da gp91phox

A expressão gênica da subunidade catalítica da NADPH oxidase, gp91phox, foi avaliada em tecido cavernoso de animais controle sedentários (C-SD), controle treinado (CTR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). O treinamento físico (C-TR) não promoveu alteração na expressão da gp91phox, quando comparado ao grupo C-SD. No entanto, os animais tratados com L-NAME (LN-SD) apresentaram aumento significativo na expressão da gp91phox, comparada aos animais C-SD. Este aumento da expressão da gp91phox foi significativamente revertido pelo treinamento físico (LN-TR; *Figura 23*).

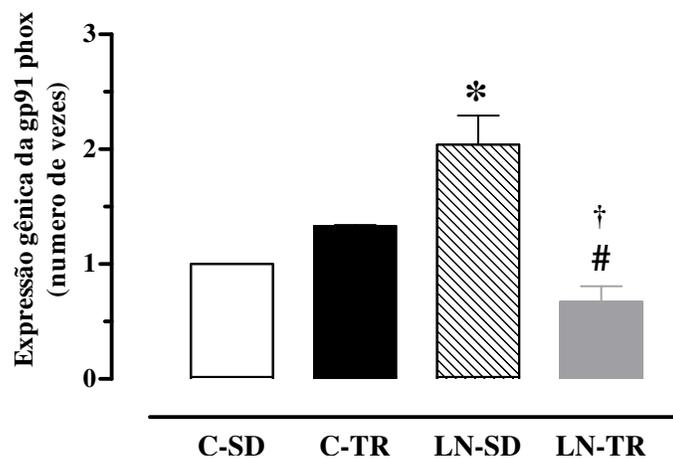


Figura 23. Expressão gênica do componente da NAD(P)H oxidase (gp91phox) em animais controle-sedentário (C-SD), controle-treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD) e L-NAME treinado (LN-TR). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para n experimentos. * $p < 0,05$, comparado ao grupo C-SD; # $p < 0,05$, comparado com o grupo LN-SD; † $p < 0,05$, comparado com o grupo C-TR.

4.DISSCUSSÃO

Neste trabalho, procuramos investigar os efeitos do treinamento físico regular na função erétil de ratos saudáveis e deficientes crônicos de NO. Na primeira etapa (protocolo experimental nº 1), avaliamos a influência do treinamento físico na função erétil de ratos saudáveis normotensos, e demonstramos que a atividade física por 8 semanas desempenha efeito benéfico pois amplifica a resposta funcional de corpos cavernosos de ratos mediada pelo NO.

Está bem estabelecido que a atividade física modifica a atividade simpática e parassimpática em animais de laboratórios e humanos (Krieger et al., 1998). No entanto, poucos estudos focaram a influência do treinamento físico no sistema não-adrenérgico não-colinérgico (Schifter et al., 1995, Gharakhanlou et al., 1999), e nenhum procurou avaliar o relaxamento nitrérgico em tecido erétil. Considerando que o NO derivado da nNOS é fundamental para a resposta relaxante do tecido cavernoso (Andersson & Wagner 1995), especulamos que o aumento do relaxamento do corpo cavernoso de rato após programa de treinamento dinâmico era consequência de aumento da atividade da nNOS ao nível de fibras nitrérgicas do tecido erétil ou de aumento na transdução de sinal NO-GMPc na musculatura lisa vascular. Nossos resultados mostraram que a atividade física aumentou a resposta relaxante aos doadores de NO, SNP e NaNO₂ acidificado, bem como à estimulação elétrica (relaxamento nitrérgico). Sabe-se que esses compostos ativam diretamente a GCs, levando à formação e aumento dos níveis de GMPc na musculatura lisa vascular (Denninger et al., 1999). Assim, estes achados com o NaNO₂ acidificado, SNP e EFS sugerem que a amplificação do relaxamento dos corpos cavernosos pelo treinamento físico é devido a mecanismos independentes de endotélio. Estudo prévio mostrou que a ativação da nNOS inicia o processo de ereção peniana,

enquanto o NO derivado da eNOS sustentaria o processo erétil (Hurt et al., 2002). Entretanto, em nosso estudo, observamos que nem a potência nem a resposta máxima ao agonista muscarínico, ACh, foi alterada significativamente após 8 semanas de treinamento físico. Considerando a baixa potência (da ordem de 5) e resposta máxima (da ordem de 30%) da ACh em corpo cavernoso de ratos sedentários e treinados, nossos resultados sugerem a existência de uma pequena população de receptores muscarínicos neste tecido. Esses dados estão de acordo com a baixa resposta relaxante induzida pelo agonista muscarínico, carbacol, em corpo cavernoso de ratos (Hedlund et al., 1999).

Alguns estudos têm mostrado uma diminuição da sensibilidade ao agonista α -adrenérgico, noradrenalina, em artérias coronárias e aorta após atividade física (Wiegman et al., 1981; Johnson et al., 2000). No entanto, nossos resultados não mostraram alterações na sensibilidade do tecido erétil em resposta à fenilefrina, indicando que, neste tecido em particular, o treinamento físico não induz alterações na ação vasoconstritora mediada pelos α -adrenoceptores. Em corpo cavernoso de ratos, a ET-1 exerce ação vasoconstritora pela ativação dos receptores ET_A associados à via da RhoA/Rho-kinase (Wingard et al., 2003). Em nosso estudo, a ET-1 exerceu uma potente ação vasoconstritora no corpo cavernoso de ratos sedentários que não foi alterada pelo treinamento físico, indicando que a atividade física não modifica a resposta contrátil mediada pela ativação de receptores ET_A.

Alguns estudos epidemiológicos têm mostrado uma forte associação entre disfunção erétil e hipertensão arterial, onde se sugere que a deficiência de NO é a principal causa da disfunção erétil nesta condição patológica (Muller et al., 1991; Burnett 1997; Aranda et al., 2004). Aproximadamente 30% dos pacientes hipertensos possuem

algum nível de disfunção erétil, que está diretamente relacionado à gravidade e período da hipertensão arterial (Burchardt et al., 2000). Assim, na segunda etapa deste trabalho, analisamos o efeito do pré-condicionamento físico na função erétil de ratos deficientes de NO. Nossos resultados mostraram que o pré-condicionamento físico por 8 semanas atenuou a hipertensão arterial causada pelo tratamento prolongado com L-NAME. Resultados semelhantes foram encontrados por Kuru et al (2002), que demonstraram que o treinamento físico previne o aumento da pressão arterial em ratos hipertensos submetidos ao tratamento crônico com L-NAME. O treinamento físico também previne o aumento de pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos (SHR; Horta et al., 2005), enfatizando o efeito protetor do exercício físico na hipertensão arterial. No entanto, os mecanismos responsáveis por este efeito ainda não estão bem esclarecidos. Tem sido sugerido que o treinamento físico “melhora” a função vascular devido a fatores vasculares dependentes e independentes de endotélio (Kingwell., 2000; Maiorana et al., 2000). O exercício físico regular é recomendado como terapia não farmacológica na prevenção primária da hipertensão e de outras doenças cardiovasculares, sendo conhecido como agente hipotensor, tanto em humanos como em modelos animais (Brum et al., 2000; Kokkinos et al., 2001; Chrysohoou et al., 2003).

Em nosso estudo, o pré-condicionamento físico promoveu uma “melhora” na função erétil dos animais deficientes crônicos de NO em resposta ao SNP, ACh, estímulo elétrico (*in vitro*) e pressão intracavernosa (*in vivo*). Para avaliarmos os efeitos do treinamento no relaxamento de corpo cavernoso independente da liberação de NO endógeno, avaliamos a resposta relaxante do SNP. Observamos que o relaxamento máximo induzido pelo SNP foi significativamente aumentado pelo treinamento, mesmo

quando associado ao tratamento com 2 ou 10 mg de L-NAME. O aumento da resposta máxima do SNP em ratos deficientes crônicos de NO sugere que a atividade física altera a sensibilidade da sinalização da GCs. Esses dados corroboram com dados apresentados na primeira etapa do trabalho, onde o treinamento físico ampliou o relaxamento devido à ativação da via de sinalização NO-GMPc. Diante destes resultados, decidimos investigar o efeito relaxante de um estimulador da GCs independente de NO, o BAY 41-2272, e um inibidor seletivo da PDE5, o sildenafil. Nossos resultados mostraram que o treinamento e/ou tratamento com L-NAME não afetaram nem a potência nem a resposta máxima do BAY 41-2272. O fato de não observarmos o mesmo perfil de resposta para o SNP e o BAY 41-2272 pode ser devido à capacidade do NO de ativar a GCs num sítio de ligação diferente da do BAY 41-2272 (Kosarikov et al., 2001). Além disso, recentemente foi descrito que o BAY 41-2272, além de estimular a GCs, promove inibição da PDE5 (Mullershausen *et al.*, 2004). A PDE5 é a enzima responsável pelo controle do metabolismo do GMPc no corpo cavernoso (Corbin 2004). O sildenafil aumenta os níveis intracelulares de GMPc, potencializando o relaxamento dependente de NO *in vitro* e *in vivo* em ratos (Schafer et al., 2008). Em nosso estudo, o sildenafil produziu um relaxamento dependente da concentração; porém, nem a potência nem a resposta máxima ao sildenafil foram alteradas pelo treinamento físico. Assim, a PDE5 parece não estar envolvida na amplificação da resposta relaxante de corpo cavernoso de ratos após o programa de pré-condicionamento físico. Além disso, Jackson (2005) demonstrou que o exercício físico não promove alterações hemodinâmicas em resposta aos inibidores da PDE5, sildenafil, vardenafil e tadalafil, em pacientes com isquemia. Sugerindo assim, que

o exercício físico não promove alterações hemodinâmicas e funcionais ao ser associado a um inibidor de PDE5.

Como mencionado acima o NO nitrérgico desempenha papel fundamental na regulação do tônus vascular, sendo considerado atualmente o principal mediador do relaxamento neurogênico do músculo liso peniano (Andersson, 2001). Estudo prévio mostrou que o endotélio libera NO em resposta à ACh no pênis (Saenz 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 provável que o endotélio sinusoidal, através da liberação de NO, apenas auxilie na ereção peniana (Blanco et al., 1988; Knispel et al., 1991). Assim, decidimos investigar o efeito do pré-condicionamento no relaxamento induzido pela ACh e pelo EFS em animais controles e deficientes crônico de NO. Observamos que a resposta relaxante induzida pela ACh e EFS foi reduzida pelo tratamento com L-NAME (2 e 10 mg), que parece se correlacionar com o grau de hipertensão arterial. Em nosso estudo, embora as doses de L-NAME tenham elevado significativamente a pressão arterial, os relaxamentos induzidos pela ACh e EFS não foram totalmente abolidos, indicando que o tratamento com L-NAME não causa inibição total das NOS ao nível de tecido erétil. Além disso, a redução da resposta relaxante causada pelo tratamento crônico com L-NAME (2 e 10 mg) foi prevenida significativamente pelo treinamento físico. Também avaliamos a influência do pré-condicionamento físico *in vivo*, através de medidas de pressão intracavernosa, e observamos que o tratamento crônico com L-NAME reduziu tanto a razão ICP/MAP como a AUC. O treinamento físico reverteu significativamente a redução da AUC proporcionada pelo L-NAME, reforçando que o pré-condicionamento melhora a

reatividade da musculatura lisa cavernosa e conseqüentemente a função erétil de ratos hipertensos.

A atividade física melhora a função endotelial em modelos animais de hipertensão arterial e em pacientes hipertensos, estando associada a alterações benéficas na pressão sanguínea, no metabolismo lipídico, no metabolismo da glicose, na liberação de fatores neuro-humorais, no peso corporal e na resposta a estímulos mecânicos como o *shear stress* (Martin et al., 1990; Wood et al., 1991; Arakawa, 1993; Paffenbarger et al., 1993). O *shear stress* é reconhecido como um possível mecanismo no qual o exercício aeróbio melhora a função endotelial. Este estímulo mecânico é resultante do aumento do fluxo sanguíneo que produz uma força de cisalhamento na parede vascular, estimulando a liberação de NO em vasos isolados e culturas de células pela via de sinalização Akt (Miller & Vanhoute, 1988; Uematsu et al., 1995; Kojda & Hambrecht 2005; Prieto 2008). O aumento de *shear stress* em artérias coronárias de cães submetidos a treinamento promove *up-regulation* dos níveis de RNAm e proteína da eNOS, melhorando a função endotelial e conseqüentemente a produção de NO (Sessa *et al.*, 1994). Além disso, sabe-se que a atividade física, provavelmente pelo *shear stress*, exerce um efeito benéfico na função endotelial através da ativação de várias vias de transdução de sinais (Traub & Berk, 1998), como proteínas G (Tseng et al., 1995), canais iônicos (Schwartz & Lechene, 1992), integrinas (Muller et al., 1997) e tirosinas quinase c-Src. Estas vias exercem função importante na modulação da expressão da eNOS e da atividade de enzimas antioxidantes como as SOD durante a atividade física (Traub & Berk, 1998; Davis et al., 2001; 2003).

Além disso, apoiando a hipótese que o pré-condicionamento aumenta a biodisponibilidade de NO pelo aumento do *shear stress*, avaliamos o efeito do treinamento nos níveis plasmáticos de NOx. O pré-condicionamento físico aumentou significativamente os níveis plasmáticos de NOx em relação aos respectivos controles sedentários. De fato, evidências têm mostrado que o exercício físico aumenta as concentrações de NOx tanto em animais de laboratório quanto em humanos (Xiao & Qian 2000; Qian et al., 2001; Banfi et al., 2006). Estes resultados corroboram com nossos resultados *in vitro* e *in vivo* mostrando que o pré-condicionamento promove aumento significativo nas respostas relaxantes mediadas por NO, além de restaurar parcialmente as respostas do relaxamento dependente de endotélio e do relaxamento neurogênico nos ratos deficientes crônicos de NO, possivelmente pelo aumento da biodisponibilidade de NO e conseqüentemente ampliação na via de sinalização do NO-GMPc.

Na terceira etapa do trabalho, avaliamos o efeito do pós-condicionamento físico (eficácia terapêutica) na função erétil de ratos deficientes crônicos de NO. Nossos resultados mostraram que o pós-condicionamento, iniciado após 4 semanas do tratamento com L-NAME, atenuou significativamente a hipertensão arterial, e “melhorou” o relaxamento dos corpos cavernosos e ratos induzidos pelo SNP, ACh e EFS, assim como reverteu a redução da ICP *in vivo*. Em relação aos níveis de NOx, o pós-condicionamento físico atenuou a redução dos níveis deste metabólito nos ratos deficientes de NO. Este conjunto de resultados é bastante semelhante àqueles do pré-condicionamento, reforçando que o treinamento físico, quer na forma de pré ou de pós-condicionamento, desempenha efeitos benéficos em condições fisiológicas e patológicas, provavelmente por aumentar a biodisponibilidade de NO.

Na busca pelo mecanismo responsável pelo aumento da biodisponibilidade de NO proporcionado pelo pós-condicionamento físico, investigamos, inicialmente, a expressão protéica da nNOS, principal isoforma da NOS responsável pela síntese do NO no processo da ereção peniana (Gonzales-Cadavid et al., 1999; Andersson, 2001; Gonzales-Cadavid & Rajfer 2004). No entanto, a expressão protéica desta isoforma em corpo cavernoso de ratos deficientes crônicos de NO não se mostrou alterada em nenhum grupo avaliado. No corpo cavernoso e próstata, a nNOS possui uma variante constituída por 34 aminoácidos inseridos entre os exons 16 e 17. Essa variante, denominada nNOS peniana (PnNOS; Gonzales-Cadavid & Rajfer 2004), é supostamente essencial na neurotransmissão nitrérgica, controlando a ereção peniana. Em nosso estudo, a variante PnNOS está presente no tecido cavernoso de ratos, em todos os grupos analisados. Porém, nenhuma diferença na expressão protéica da PnNOS foi encontrada entre os diversos grupos, sugerindo que a melhora do pós-condicionamento físico na função erétil não é devido ao aumento da expressão protéica da nNOS ou da variante PnNOS.

Na seqüência, decidimos avaliar se o pós-condicionamento físico afeta o estresse oxidativo nos animais. Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo ocorre quando o sistema antioxidante não consegue atuar contra a produção excessiva de ERO. É sabido que a produção excessiva de ERO leva a disfunções celulares, peroxidação lipídica, mutagenicidade do DNA, que podem gerar danos celulares irreversíveis e morte celular (Sawyer et al., 2002; Giordano et al., 2005; Murdoch et al., 2006; Takimoto & Kass 2007). Diversos trabalhos mostram aumento do estresse oxidativo em animais submetidos a diferentes modelos de hipertensão arterial, como hipertensão induzida por angiotensina II (Rajacopalan et al., 1996; Laursen et al., 1997), mineralocorticóides

(Beswick et al., 2001), hipertensão renovascular (Heitzer et al., 1999; Jung et al., 2004) e SHR (Tanito et al., 2004), assim como em humanos (Touyz 2004). O aumento do estresse oxidativo em pacientes hipertensos é acompanhado de redução da atividade de enzimas antioxidantes endógenas no sangue e em células mononucleares (Redon et al., 2003), não deixando de enfatizar que a redução da disponibilidade de NO pelo aumento da ERO piora a função endotelial e possivelmente a função erétil (Keegan et al., 1999; Burnett et al., 2006).

Durante o exercício físico, o estresse oxidativo causa diferentes tipos de respostas que parecem ter relação com o tipo de tecido estudado e com os níveis de antioxidantes endógenos (Liu et al., 2002). Por outro lado, o exercício crônico de intensidade moderada é um tratamento capaz de alterar positivamente a homeostase oxidativa de células e de tecidos, por diminuir os níveis de danos oxidativos e aumentar a resistência ao estresse oxidativo (Niess et al., 1999; Venditti 2001; Cooper et al., 2002). A determinação do conteúdo do resíduo da proteína nitrada, nitrotirosina (3-NT), é freqüentemente utilizada para detectar danos oxidativos nos tecidos. A nitração de proteína é apontada como o alvo final da reação do O_2^- com o NO, formando o $ONOO^-$ (Chirino et al., 2004). Níveis elevados de proteínas nitradas são encontrados em várias doenças como hiperlipidemia, Alzheimer, diabetes mellitus, aterosclerose e hipertensão arterial (Guo et al., 2003; Chirino et al., 2004). A 3-NT tem sido detectada em vários órgãos e tipos celulares, tanto em humanos como em animais (Shishehbor et al., 2003). A nitração do resíduo de tirosina livre leva a modificações protéicas, alterando enzimas como tirosina hidroxilase, Ca^{2+} -ATPase, prostaciclina síntase, e MnSOD (Castro et al., 2004). Nossos resultados mostraram que a nitração protéica está aumentada nos ratos deficientes crônicos de NO,

sendo este aumento significativamente revertido pela atividade física. É possível que isto seja devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes resultando na redução da formação de ONOO⁻. Apesar da 3-NT representar indiretamente a formação de ONOO⁻, alguns trabalhos têm mostrado que outras proteínas, normalmente presentes nos tecidos, como as hemoproteínas, podem catalisar a formação de 3-NT, sem necessariamente levar à formação de ONOO⁻ (Kilinc *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2004).

Dando continuidade a eficácia terapêutica da atividade física no estresse oxidativo, avaliamos a expressão protéica e atividade plasmática da SOD. Recentemente, Rush *et al.*, (2005) demonstraram que o exercício aeróbio regular por 12 semanas induz aumento da expressão protéica e atividade da CuZnSOD (SOD-1; presente no citosol e no núcleo), e reduz o estresse oxidativo melhorando a biodisponibilidade de NO em aorta de porcos. Em aorta de camundongos, o treinamento físico moderado por 3 semanas foi capaz de aumentar a expressão protéica da EC-SOD (SOD-3 extracelular; presente na matriz extracelular), mas não da CuZnSOD (Fukai *et al.*, 2000). Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo, onde a expressão da CuZnSOD não foi modificada em nenhum dos grupos analisados. No entanto, a atividade plasmática da SOD foi reduzida nos deficientes crônicos de NO, sendo esta redução atenuada pelo exercício físico regular. A diminuição da atividade plasmática da SOD também foi observada em ratos hipertensos submetidos ao tratamento crônico com L-NAME (Priviero *et al.*, 2007) e em ratos SHR (Newaz & Nawal 1998; Schnackenberg & Wilcox 1999; Ushiyama *et al.*, 2004). No entanto, a capacidade do exercício físico de atenuar a redução da atividade plasmática da SOD em animais hipertensos pode ser devido ao *shear-stress*, que estimula o endotélio, aumentando o transporte de L-arginina, os níveis de Ca²⁺ intracelulares, a

atividade e expressão da eNOS e a atividade da SOD, promovendo maior biodisponibilidade de NO (Posch et al., 1999).

A formação em excesso do O_2^- está associado à fisiopatologia de doenças cardiovasculares (Jeremy et al., 2002; Jiang et al., 2004, Li & Shah 2004; Hayashi et al., 2005; Muzaffar et al., 2005), não esquecendo que o excesso de O_2^- pode interagir com o NO, resultando na formação do $ONOO^-$, uma espécie reativa capaz de promover alterações e danos celulares e ativação de metaloproteases contribuindo para o remodelamento vascular (Turko & Murad 2002; Pacher et al., 2005; Katori et al., 2006). O aumento da expressão e da atividade do complexo NADPH oxidase tem sido implicado na etiologia das doenças cardiovasculares, pela capacidade de aumentar a formação de O_2^- . O complexo enzimático NADPH oxidase é composto por subunidades denominadas NOX (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 e NOX5) e subunidades regulatórias (p22phox, p40phox, p47phox e p67phox e a Rac). Podem ser localizadas em células glomerulares (Jones et al., 1995), fibroblastos (Pagano et al., 1997), cardiomiócitos (Bendall et al., 2002; Satoh et al., 2006), célula muscular lisa vascular (Griendling et al., 1994) e células endoteliais (Frey et al., 2002; Li & Shah 2003). A subunidade NOX2, também conhecida como gp91phox, é a principal subunidade catalítica responsável pela ativação do complexo NADPH e geração de ERO (Muzaffar et al., 2005). Diversos trabalhos mostraram que a atividade física regular com intensidade moderada reduz a expressão e a atividade enzimática do complexo enzimático NADPH oxidase, resultando na redução da formação de O_2^- , aumentando assim a biodisponibilidade de NO (Bejma & Ji 1999; Hambrecht et al., 2003). Recentemente, Adams et al (2005) mostraram que a expressão gênica das subunidades gp91phox, NOX4, e p22phox é reduzida pelo aumento do *shear*

stress resultante do treinamento físico. Resultados similares foram encontrados em cultura de células de endotélio bovino, onde o aumento do *shear stress* resultou na redução da expressão gênica da gp91phox e NOX4, reduzindo a geração de ERO (Hwang et al., 2003). Esses resultados corroboram com os dados obtidos em nosso estudo, onde o pós-condicionamento físico reduziu a expressão gênica da gp91phox na musculatura lisa cavernosa de ratos deficientes crônicos de NO. Isto indica que a atividade física é capaz de regular a expressão do complexo NADPH oxidase em corpo cavernoso de ratos melhorando a função erétil.

5. *SUMÁRIO E CONCLUSÃO*

No presente trabalho demonstrou-se que:

➤ O treinamento físico em ratos saudáveis

- Não alterou a resposta contrátil do corpo cavernoso de ratos em resposta à fenilefrina e ET-1;
- Aumentou o relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo nitrito de sódio acidificado, SNP e EFS;

➤ O pré-condicionamento físico em ratos deficientes crônicos e NO

- Atenuou a hipertensão arterial induzida pelo L-NAME;
- Aumentou o relaxamento do corpo cavernoso induzido pelo SNP;
- Atenuou significativamente a redução do relaxamento do corpo cavernoso induzido pela ACh e EFS nos animais tratados com L-NAME;
- Não alterou a resposta relaxante do corpo cavernoso induzido pelo BAY 41-2272 e sildenafil;
- Atenuou significativamente a redução da pressão intracavernosa nos animais tratados com L-NAME;
- Aumentou os níveis plasmáticos de NO_x, e reverteu parcialmente a redução causada pelo L-NAME;

➤ O pós-condicionamento físico em ratos deficientes crônicos de NO

- Atenuou a hipertensão arterial induzida pelo L-NAME;
- Aumentou o relaxamento do corpo cavernoso induzido pelo SNP;
- Atenuou significativamente a redução do relaxamento do corpo cavernoso induzido pela ACh e EFS nos animais tratados com L-NAME;
- Atenuou significativamente a redução da pressão intracavernosa nos animais tratados com L-NAME;
- Aumentou os níveis plasmáticos de NO_x, e atenuou a redução causada pelo L-NAME;
- Não alterou a expressão protéica da nNOS e PnNOS em nenhum dos grupos analisados;
- Atenuou o aumento da 3-NT no corpo cavernoso dos animais tratados com L-NAME;
- Não alterou a expressão protéica SOD-1 em nenhum dos grupos analisados. Porém, aumentou a atividade plasmática da SOD, e atenuou a redução causada pelo L-NAME;
- Reduziu os níveis de expressão gênica da gp91phox, revertendo o aumento causado pelo L-NAME.

- Portanto, o treinamento físico pode ser considerado uma estratégia não farmacológica eficiente no combate à disfunção erétil pois controla o estresse oxidativo, aumentando a biodisponibilidade de NO, atenuando desta forma a deficiência da via NO/GMPc no tecido erétil.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS V, LINKE A, KRÄNKEL N, ERBS S, GIELEN S, MÖBIUS-WINKLER S, GUMMERT JF, MOHR FW, SCHULER G, HAMBRECHT R. (2005) Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. **Circulation.** 111(5):555-62.
- AGARWAL A, NANDIPATI KC, SHARMA RK, ZIPPE CD, RAINA R. (2006) Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. **J Androl.**, 27(3):335-47.
- AGO T, KITAZONO T, OOBOSHI H, IYAMA T, HAN YH, TAKADA J, WAKISAKA M, IBAYASHI S, UTSUMI H, IIDA M (2004) Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. **Circulation.**, 20;109(2):227-33.
- ANDERSSON K-E & WAGNER G. (1995) Physiology of penile erection. **Physiol. Rev.**, 75: 191-236.
- ANDERSSON KE. (2001) Pharmacology of penile erection. **Pharmacol Rev.**, 53: 417 – 450.
- ANDERSSON KE. (2003) Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. **J Urol.**, 170: S6-13.
- ARAKAWA K. (1993) Antihypertensive mechanism of exercise. **J Hypertens.**, 11: 223–229.
- ARANDA P, RUILOPE LM, CALVO C, LUQUE M, COCA A, GIL DE MIGUEL A. (2004) Erectile dysfunction in essential arterial hypertension and effects of sildenafil: results of a Spanish national study. **Am J Hypertens.**, 17(2):139-45.
- AZADZOI KM & SAENZ DE TEJADA I. (1991) Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. **J Urol.**, 146: 238-240.
- BANFI G, MALAVAZOS A, IORIO E, DOLCI A, DONEDA L, VERNA R, CORSI MM. (2006) Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. **Eur J Appl Physiol.**, 96: 483-486.

- BAYLIS C, MITRUKA B, DENG A. (1992) Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. **J Clin Invest.**, 90(1):278-81.
- BEJMA J, JI LL. (1999) Aging and acute exercise enhance free radical generation in rat skeletal muscle. **J Appl Physiol.**, 87(1):465-70.
- BENDALL JK, CAVE AC, HEYMES C, GALL N, SHAH AM. (2002) Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. **Circulation.**, 22;105(3):293-6.
- BESWICK RA, DORRANCE AM, LEITE R, WEBB RC. (2001) NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. **Hypertension.**, 38(5):1107-11.
- BLAIR SN, GOODYEAR NN, WYNNE KL, SAUNDERS RP. (1984) Comparison of dietary and smoking habit changes in physical fitness improvers and nonimprovers. **Prev Med.**, 13(4):411-20.
- BLANCO R, SAENZ DE TEJADA I, GOLDSTEIN I, KRANE RJ, WOTIZ HH & COHEN RA. (1990) Dysfunctional penile cholinergic nerves in diabetic impotent men. **J Urol.**, 144: 278-280.
- BLANCO R, SAENZ DE TEJADA I, GOLDSTEIN I, KRANE RJ, WOTIZ HH, COHEN RA. (1988) Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. II. Acetylcholine synthesis. **Am J Physiol.**, 254(3 Pt 2): H468-72.
- BORTOLOTTI A, PARAZZINI F, COLLI E & LANDONI M. (1997) The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. **Int J Androl.**, 20: 323-334.
- BRUM PC, DA SILVA GJ, MOREIRA ED, IDA F, NEGRAO CE, KRIEGER EM. (2000) Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension.**, 36: 1018-22.
- BURCHARDT M, BURCHARDT T, BAER L, KISS AJ, PAWAR RV, SHABSIGH A, DE LA TAILLE A, HAYEK OR, SHABSIGH R. (2000) Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. **J Urol.**, 164(4):1188-91.
- BURNETT AL, TILLMAN SL, CHANG TS, EPSTEIN JI, LOWENSTEIN CJ, BRETT DS, SNYDER SH, WALSH PC. (1993) Immunohistochemical localization of nitric

oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. **J Urol.**, 150(1):73-6.

BURNETT AL. (2004) Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. **Int J Impot Res.**, 16: S15-9.

BURNETT AL. (2006) The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy. **J Clin Hypertens.**, 8(12 Suppl 4):53-62.

BURNETT JC JR. (1997) Coronary endothelial function in health and disease. **Drugs.**, 53 Suppl 1:20-9.

BUTLER AR, FLITNEY FW, WILLIAMS DL. (1995) NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. **Trends Pharmacol Sci.**, 16(1):18-22.

CASTELLI WP. (1984) Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. **Am J Med.**, 76(2A):4-12.

CASTRO L, EISERICH JP, SWEENEY S, RADI R, FREEMAN BA. (2004) Cytochrome c: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration. **Arch Biochem Biophys.**, 421(1):99-107.

CHIRINO YI, HERNANDEZ-PANDO R, PEDRAZA-CHAVERRI J. (2004) Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **BMC Pharmacol.**, 4(1):20.

CHRYSOHOOU C, PITSAVOS C, PANAGIOTAKOS DB, KOKKINOS PF, STEFANADIS C, TOUTOUZAS P. (2003) The association between physical activity and the development of acute coronary syndromes in treated and untreated hypertensive subjects. **J Clin Hypertens.**, 5: 115-20.

CLAUDINO MA, PRIVIERO FB, CAMARGO EA, TEIXEIRA CE, DE NUCCI G, ANTUNES E, ZANESCO A. (2007) Protective effect of prior physical conditioning on relaxing response of corpus cavernosum from rats made hypertensive by nitric oxide inhibition. **Int J Impot Res.**, 19(2):189-95.

- CLAUDINO MA, PRIVIERO FB, TEIXEIRA CE, DE NUCCI G, ANTUNES E, ZANESCO A. (2004) Improvement in relaxation response in corpus cavernosum from trained rats. **Urology.**, 63(5):1004-8.
- CLEMPUS RE, SORESCU D, DIKALOVA AE, POUNKOVA L, JO P, SORESCU GP, SCHMIDT HH, LASSÈGUE B, GRIENDLING KK. (2006) Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 27(1):42-8.
- COOPER D, STOKES KY, TAILOR A, GRANGER DN. (2002) Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. **Cardiovasc Toxicol.**, 2(3):165-80.
- DARLEY-USMAR V, WHITE R. (1997) Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for cardiovascular disease. **Exp Physiol.**, 82(2):305-16.
- DAVIS M E, CAI H, DRUMMOND GR, & HARRISON DG. (2001) Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c- Src by divergent signaling pathways. **Circ Res.**, 89: 1073– 1080.
- DAVIS ME, CAI H, MCCANN L, FUKAI T, & HARRISON DG. (2003) Role of c-Src in regulation of endothelial nitric oxide synthase expression during exercise training. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 284:H1449– H1453.
- DE GROAT W & BOOTH A. (1993) Neural control of penile erection. **London: Hawoord.**, pp. 465-513.
- DEAN RC & LUE TF. (2005) Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urol Clin North Am.**, (4):379-95.
- DELP MD, McALLISTER RM, LAUGHLIN MH. (1993) Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. **J Appl Physiol.**, 75: 1354-1363.
- DENNINGER JW & MARLETTA MA. (1999) Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta.**, 1411(2-3):334-50.

- DUNCAN JJ, FARR JE, UPTON SJ, HAGAN RD, OGLESBY ME, BLAIR SN. (1985)
The effects of aerobic exercise on plasma catecholamines and blood pressure in patients with mild essential hypertension. **JAMA.**, 254(18): 2609-13.
- EHMKE H, JÜNEMANN KP, MAYER B, KUMMER W. (1995) Nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide colocalization in neurons innervating the human penile circulation. **Int J Impot Res.**, 7(3):147-56.
- ESCRIG A, GONZALEZ-MORA JL & MAS M (1999) Nitric oxide release in penile corpora cavernosa in a rat model of erection. *J Physiol*, **516**: 261-269.
- FLAVAHAN NA, VANHOUTTE PM. (1995) Endothelial cell signaling and endothelial dysfunction. **Am J Hypertens.**, 8(5 Pt 2): 28S-41S.
- FRANKLIN BA, GORDON S, TIMMIS GC. (1991) Exercise prescription for hypertensive patients. **Ann Med.**, 23(3): 279-87.
- FREUD BJ, WADE GE, CLAUBAUGH JR. (1988) Effect of exercise on atria natriuretic factor. **Sport Med.**, 6: 346-364
- FREY RS, RAHMAN A, KEFER JC, MINSHALL RD, MALIK AB. (2002) PKCzeta regulates TNF-alpha-induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. **Circ Res.**, 17;90(9):1012-9.
- FUKAI T, SIEGFRIED MR, USHIO-FUKAI M, CHENG Y, KOJDA G, HARRISON DG. (2000) Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. **J Clin Invest.**, 1631-9.
- GARBAN H, VERNET D, FREEDMAN A, RAJFER J & GONZALEZ-CADAVID N (1995) Effect of aging on nitric oxide-mediated penile erection in rats. *Am J Physiol*, **268**: H467-H475.
- GHARAKHANLOU R, CHADAN S, GARDINER P. (1999) Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. **Neuroscience.**, 89(4):1229-39.
- GIORDANO FJ. (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. **J Clin Invest.**, 115(3):500-8.

- GOLDSTEIN AM, MEEHAN JP, ZAKHARY R, BUCKLEY PA, ROGERS FA. (1982) New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. **Urology.**, (3):259-66.
- GONZALEZ-CADAVID NF, IGNARRO LJ, RAJFER J. (1999) Nitric Oxide and the Cyclic GMP System in the Penis. **Mol Urol.**, 51-59.
- GONZALEZ-CADAVID NF, RAJFER J. (2004) Molecular pathophysiology and gene therapy of aging-related erectile dysfunction. **Exp Gerontol.** 1705-12.
- GRIENDLING KK, MINIERI CA, OLLERENSHAW JD, ALEXANDER RW. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, 74(6):1141-8.
- GUO W, ADACHI T, MATSUI R, XU S, JIANG B, ZOU MH, KIRBER M, LIEBERTHAL W, COHEN RA. (2003) Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, (4):H1396-403.
- HALATA Z, MUNGER BL. (1986) The neuroanatomical basis for the prostatic sensibility of the human glans penis. **Brain Res.**, (2):205-30.
- HAMBRECHT R, ADAMS V, ERBS S, LINKE A, KRÄNKEL N, SHU Y, BAITHER Y, GIELEN S, THIELE H, GUMMERT JF, MOHR FW, SCHULER G. (2003) Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation.**, 107(25):3152-8.
- HAMER M. (2006) Exercise and psychobiological processes: implications for the primary prevention of coronary heart disease. **Sports Med.**, 36(10):829-38.
- HAMILTON KL, STAIB JL, PHILLIPS T, HESS A, LENNON SL, POWERS SK. (2003) Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. **Free Radic Biol Med.**, 1;34(7):800-9.

- HARRISON DG, OHARA Y. (1995) Physiologic consequences of increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis: implications for impaired vasomotion. **Am J Cardiol.**, 23;75(6):75B-81B.
- HARTLEY LH, MASON JW, HOGAN RP, JONES LG, KOTCHEN TA, MOUGEY EH, WHERRY FE, PENNINGTON LL, RICKETTS PT. (1972) Multiple hormonal responses to prolonged exercise in relation to physical training. **J Appl Physiol.**, 33(5): 607-10.
- HAYASHI T, JULIET PA, KANO-HAYASHI H, TSUNEKAWA T, DINGQUNFANG D, SUMI D, MATSUI-HIRAI H, FUKATSU A, IGUCHI A. (2005) 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.**, 7(4):334-43.
- HAYASHIDA H, OKAMURA T, TOMOYOSHI T & TODA N (1996) Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum. *J Urol*, **155**: 1122-1127.
- HEDLUND P, ALM P, ANDERSSON KE (1999) NO synthase in cholinergic nerves and NO induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. **Br J Pharmacol.**, 127: 349-60.
- HEITZER T, WENZEL U, HINK U, KROLLNER D, SKATCHKOV M, STAHL RA, MACHARZINA R, BRÄSEN JH, MEINERTZ T, MÜNZEL T. (1999) Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. **Kidney Int.**, 55(1):252-60.
- HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)**, 11(9):1026-30.
- HOLMQUIST F, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1991) L-N^G-nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum. **Acta Physiol Scand**, 141: 441-442.
- HOLMQUIST F, HEDLUND H & ANDERSSON KE (1992) Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **J Physiol**, 449: 295-311.

- HORTA PP, DE CARVALHO JJ, MANDARIM DE LACERDA CA (2005) Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. **Life Sci.**, 26:3336-43.
- HURT KJ, MUSICKI B, PALESE MA, CRONE JK, BECKER RE, MORIARITY JL, SNYDER SH, BURNETT AL. (2002) Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 99(6):4061-6.
- HWANG J, ING MH, SALAZAR A, LASSÈGUE B, GRIENDLING K, NAVAB M, SEVANIAN A, HSAI TK. (2003) Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. **Circ Res.**, 93(12):1225-32.
- IGNARRO LJ, BUSH PA, BUGA GM, WOOD KS, FUKUTO JM & RAJFER J. (1990) Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem Biophys Res. Commun.**, 170: 843-850.
- IGNARRO, L. & MURAD, F. (1995) Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. **Advances in Pharmacology.**, 34: 1-516.
- JACKSON G. (2005) Hemodynamic and exercise effects of phosphodiesterase 5 inhibitors. **Am J Cardiol.**, 26;96(12B):32M-36M.
- JEREMY JY & MIKHAILIDIS DP. (1998) Cigarette smoking and erectile dysfunction. **J R Soc Health.**, 118: 151-155.
- JEREMY JY, JONES RA, KOUPPARIS AJ, HOTSTON M, PERSAD R, ANGELINI GD, SHUKLA N. (2007) Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. **Int J Impot Res.**, 19(3):265-80.
- JEREMY JY, YIM AP, WAN S, ANGELINI GD. (2002) Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease. **J Card Surg.**, 17(4):324-7.
- JIANG F, DRUMMOND GR, DUSTING GJ. (2004) Suppression of oxidative stress in the endothelium and vascular wall. **Endothelium.**, 11(2):79-88.

- JIANG R, CHEN JH, JIN J, SHEN W, LI QM. (2005) Ultrastructural comparison of penile cavernous tissue between hypertensive and normotensive rats. **Int J Impot Res.**, 17(5):417-23.
- JIN L, BURNETT AL. (2008) NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction. **Asian J Androl.**, 10(1):6-13.
- JOHANNES CB, ARAUJO AB, FELDMAN HA, DERBY CA, KLEINMAN KP, MCKINLAY JB. (2000) Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J Urol.**, 163(2):460-3.
- JOHNSON LR, PARKER JL, LAUGHLIN MH. (2000) Chronic exercise training improves ACh-induced vasorelaxation in pulmonary arteries of pigs. **J Appl Physiol.**, 88(2):443-51.
- JONES SA, HANCOCK JT, JONES OT, NEUBAUER A, TOPLEY N. (1995) The expression of NADPH oxidase components in human glomerular mesangial cells: detection of protein and mRNA for p47phox, p67phox, and p22phox. **J Am Soc Nephrol.**, 5(7):1483-91.
- JUNG O, SCHREIBER JG, GEIGER H, PEDRAZZINI T, BUSSE R, BRANDES RP. (2004) gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. **Circulation.**, 109(14):1795-801.
- KATORI H, NOZAWA A, TSUKUDA M. (2006) Increased expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 and human papilloma virus infection are associated with malignant transformation of sinonasal inverted papilloma. **J Surg Oncol.**, 93(1):80-5.
- KEEGAN A, COTTER MA, CAMERON NE. (1999) Effects of diabetes and treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. **Diabetologia.**, 42(3):343-50.
- KENNEY MJ, SEALS DR. (1993) Postexercise hypotension. Key features, mechanisms, and clinical significance. **Hypertension.**, 22(5): 653-64.
- KHAN MA, THOMPSON CS, EMSLEY AM, MUMTAZ FH, MIKHAILIDIS DP, ANGELINI GD, MORGAN RJ, JEREMY JY. (1999) The interaction of

homocysteine and copper markedly inhibits the relaxation of rabbit corpus cavernosum: new risk factors for angiopathic erectile dysfunction? **BJU Int.**, 84(6):720-4.

KILINC K, KILINC A, WOLF RE, GRISHAM MB. (2001) Myoglobin-catalyzed tyrosine nitration: no need for peroxynitrite. **Biochem Biophys Res Commun.**, 285(2):273-6.

KIM N, AZADZOI KM, GOLSTEIN I & SAENZ DE TEJADA I (1991) A nitric oxide-like factor mediates neurogenic relaxation of penile smooth muscle. **J Clin Invest**, 88: 112-118.

KIM N, VARDI Y, PADMA-NATHAN H, DALEY J, GOLSTEIN I & SAENZ DE TEJADA I. (1993) Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway: physiological role in penile erection. **J Clin Invest.**, 91: 437-442.

KINGWELL BA. (2000) Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEB J.**, 14(12):1685-96.

KIRKEBY HJ, SVANE D, POULSEN J, TOTTRUP A, FORMAN A & ANDERSSON KE (1993) Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in relaxation of isolated human penile cavernous tissue and circumflex veins. *Acta Physiol Scand*, **149**: 385-392.

KNISPEL HH, GOESSL C & BECKMAN R (1992) Nitric oxide mediates neurogenic relaxation induced in rabbit cavernous smooth muscle by electric field stimulation. *Urology*, **40**: 471-476.

KNISPEL HH, GOESSL C & BECKMAN R. (1991) Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. **J. Urol.**, 146: 1429-1433.

KOJDA G, HAMBRECHT R. (2005) Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? **Cardiovasc Res.**, 1;67(2):187-97.

- KOJDA G, HARRISON D. (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovasc Res.**, 15;43(3):562-71.
- KOKKINOS PF, NARAYAN P, PAPADEMETRIOU V. (2001) Exercise as hypertension therapy. **Cardiol Clin.**, 19: 507-16.
- KOSARIKOV DN, LEE JM, UVERSKY VN, COUNTS GERBER N. (2001) Role of conformational changes in the heme-dependent regulation of human soluble guanylate cyclase. **J Inorg Biochem.**, 87(4):267-76.
- KRANE RJ, GOLDSTEIN I, SAENZ DE TEJADA I. (1989) Impotence. **N Engl J Med.**, (24):1648-59.
- KRIEGER EM, BRUM PC, NEGRAO CE. (1998) Role of arterial baroreceptor function on cardiovascular adjustments to acute and chronic dynamic exercise. **Biol Res.**, 31(3): 273-9.
- LAEMMLI UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, 15;227(5259):680-5.
- LASSÈGUE B, SORESCU D, SZÖCS K, YIN Q, AKERS M, ZHANG Y, GRANT SL, LAMBETH JD, GRIENDLING KK. (2001) Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circ Res.**, 11;88(9):888-94.
- LAURSEN JB, RAJAGOPALAN S, GALIS Z, TARPEY M, FREEMAN BA, HARRISON DG. (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. **Circulation.**, 95(3):588-93.
- LEBLANC J, BOULAY M, DULAC S, JOBIN M, LABRIE A, ROUSSEAU-MIGNERON S. (1977) Metabolic and cardiovascular responses to norepinephrine in trained and nontrained human subjects. **J Appl Physiol.**, 42(2): 166-73.

- LEONE AM, WIKLUND NP, HOKFELT T, BRUNDIN L, MONCADA S. (1994) Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. **Neuroreport.**, 5(6): 733-6.
- LESNIAK KT, DUBBERT PM. (2001) Exercise and hypertension. **Curr Opin Cardiol.**, 16(6):356-9.
- LI J, STOUFFS M, SERRANDER L, BANFI B, BETTIOL E, CHARNAY Y, STEGER K, KRAUSE KH, JACONI ME. (2006) The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. **Mol Biol Cell.**, 17(9):3978-88.
- LI JM, SHAH AM. (2003) ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol.**, 14(8 Suppl 3):S221-6.
- LI JM, SHAH AM. (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 287(5):R1014-30.
- LINKE A, ERBS S, HAMBRECHT R. (2006) Exercise and the coronary circulation- alterations and adaptations in coronary artery disease. **Prog Cardiovasc Dis.**, 48(4):270-84.
- LIU J, YEO HC, OVERVIK-DOUKI E, HAGEN T, DONIGER SJ, CHYU DW, BROOKS GA, AMES BN. (2000) Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol.**, 89(1):21-8.
- LIU XR, GILLESPIE JS, GIBSON IF & MARTIN W (1991) Effects of NG-substituted analogues of L-arginine on NANC relaxation of the rat anococcygeus and bovine retractor penis muscles and the bovine penile artery. **Br J Pharmacol**, **104**: 53-58.
- LLOYD-JONES DM, BLOCH KD. (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. **Annu Rev Med.**, 47:365-75.
- LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEWART I, PARK J, SCHULZ S, CHEPENIK KP, WALDMAN SA. (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev.**, 52(3): 375-414.

- MAIORANA A, O'DRISCOLL G, DEMBO L, CHEETHAM C, GOODMAN C, TAYLOR R, GREEN D. (2000) Effect of aerobic and resistance exercise training on vascular function in heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 279: H1999-2005.
- MARTIN JE, DUBBERT PM, & CUSHMAN WC. (1990) Controlled trial of aerobic exercise in hypertension. **Circulation.**, 81: 1560–1567.
- MARTIN W, GILLESPIE JS & GIBSON IF (1993) Actions and interactions of NG-substituted analogues of L-arginine on NANC neurotransmission in the bovine retractor penis and rat anococcygeus muscles. *Br J Pharmacol*, **108**: 242-247.
- McCRIMMON DR, CUNNINGHAM DA, RECHNITZER PA, GRIFFITHS J. (1976) Effect of training on plasma catecholamines in post myocardial infarction patients. **Med Sci Sports.**, 8(3): 152-6.
- MCKENNA WJ, ELLIOTT PM. (1998) Hypertrophic cardiomyopathy. **Evid Based Cardiovasc Med.**, (4):89-91.
- MEIJERINK E, KOZULIC B, STRANZINGER G, NEUENSCHWANDER S. (2001) Picogram cloning and direct in situ sequencing of DNA from gel pieces. **Biotechniques.**, 31(4):802-4, 806, 808, 810.
- MELIN B, ECLACHE JP, GEELEN G, ANNAT G, ALLEVARD AM, JARSAILLON E, ZEBIDI A, LEGROS JJ, GHARIB C. (1980) Plasma AVP, neurophysin, renin activity, and aldosterone during submaximal exercise performed until exhaustion in trained and untrained men. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol.**, 44(2): 141-51.
- MILLER VM, & VANHOUTTE PM. (1988) Enhanced release of endothelium-derived factors by chronic increases in blood flow. **Am J Physiol.**, 255: H446–H451.
- MILLS TM, WIEDMEIER VT & STOPPER VS (1992) Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod*, **46**: 342-348.
- MIZUSAWA H, HEDLUND P, HAKANSSON A, ALM P, ANDERSSON KE. (2001) Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. **Br J Pharmacol.**, 132(6): 1333-41.

- MULLER JM, CHILIAN WM, & DAVIS MJ. (1997) Integrin signaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles. **Circ Res.**, 80: 320– 326.
- MULLER SC, EL-DAMANHOURY H, RUTH J, LUE TF. (1991) Hypertension and impotence. **Eur Urol.**, 19: 29-34.
- MULLERSHAUSEN F, RUSSWURM M, FRIEBE A, KOESLING D. (2004) Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272. **Circulation.**, 109(14):1711-3.
- MULVANY MJ. (1999) Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? **Cardiovasc Res.**, 41(1):9-13.
- MURDOCH CE, ZHANG M, CAVE AC, SHAH AM (2006) NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. **Cardiovasc Res.** 71(2):208-15.
- MUSICKI B, PALESE MA, CRONE JK, BURNETT AL. (2004) Phosphorylated endothelial nitric oxide synthase mediates vascular endothelial growth factor-induced penile erection. **Biol Reprod.**, 70(2):282-9.
- MUZAFFAR S, JEREMY JY, ANGELINI GD, STUART-SMITH K, SHUKLA N. (2003) Role of the endothelium and nitric oxide synthases in modulating superoxide formation induced by endotoxin and cytokines in porcine pulmonary arteries. **Thorax.**, 58(7):598-604.
- MUZAFFAR S, SHUKLA N, JEREMY JY. (2005) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase: a promiscuous therapeutic target for cardiovascular drugs? **Trends Cardiovasc Med.**, 15(8):278-82.
- NEWAZ MA, NAWAL NN. (1998) Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and total antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens.**, 11(12):1480-5.
- NISS AM, DICKHUTH HH, NORTHOFF H, FEHRENBACH E. (1999) Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. **Exerc Immunol Rev.**, 5:22-56.

- NORDBERG J, ARNÉR ES. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system of rat corpus cavernosum. **Free Radic Biol Med.**, 31(11):1287-312.
- OKAMURA T, AYAJIKI K & TODA N (1998) Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. *Am J Physiol*, **274**: H1075-H1081.
- PACHER P, SCHULZ R, LIAUDET L, SZABÓ C. (2005) Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. **Trends Pharmacol Sci.**, 26(6):302-10.
- PAFFENBARGER RS, HYDE RT, WING AL, *et al.* (1993) The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. **N Engl J Med.**, 328: 538– 545.
- PAGANO PJ, CLARK JK, CIFUENTES-PAGANO ME, CLARK SM, CALLIS GM, QUINN MT. (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 23;94(26):14483-8.
- POSCH K, SCHMIDT K, GRAIER WF. (1999) Selective stimulation of L-arginine uptake contributes to shear stress-induced formation of nitric oxide. **Life Sci.**, 64(8): 663-70.
- PRIETO D. (2008) Physiological regulation of penile arteries and veins. **Int J Impot Res.**, 20(1):17-29.
- PRIVIERO FBM, ZANESCO A, TEIXEIRA CE, NOGUEIRA TCA, ANTUNES E, DE NUCCI G, MELLO MAR, KOKOBUN E, AZEVEDO JRM, SYBUIA CY, PAPOTI M, GOBATTO CA. (2001) Maximal Lactate Steady-State determination in sedentary rats submitted to treadmill training. **Simpósio Internacional de Ciências do Esporte.**, 24: 85. Abstract.
- PUDDU P, PUDDU GM, CRAVERO E, MUSCARI A. (2004) Different effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction. **Acta Cardiol.**, 59(5):555-64.

- PUECH-LEAO P, REIS JM, GLINA S & REICHELT AC (1987) Leakage through the crural edge of the corpus cavernosum: diagnosis and treatment. **Eur Urol.**, 13: 163-165.
- QIAN ZM, XIAO S, KE Y, LIAO QK. (2001) Increase nitric oxide is one of the causes of changes of iron metabolism in strenuously exercised rats. **Am J Physiol.**, 280: R739-R743.
- RAJAGOPALAN S, KURZ S, MÜNDEL T, TARPEY M, FREEMAN BA, GRIENGLING KK, HARRISON DG. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. **J Clin Invest.**, 15;97(8):1916-23.
- REDÓN J, OLIVA MR, TORMOS C, GINER V, CHAVES J, IRADI A, SÁEZ GT. (2003) Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. **Hypertension.**, 41(5):1096-101.
- RIBEIRO MO, ANTUNES E, DE NUCCI G, LOVISOLO SM, ZATZ R. (1992) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. **Hypertension.**, 20: 298-303.
- RUSH JW, DENNISS SG, GRAHAM DA. (2005) Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. **Can J Appl Physiol.**, 30(4):442-74.
- RUSSELL JC, DOLPHIN PJ, GRAHAM SE, AMY RM, BRINDLEY DN. (2004) Improvement of insulin sensitivity and cardiovascular outcomes in the JCR:LA-cp rat by D-fen⁻uramine. **Diabetologia.**, 41: 380-389.
- SAENZ DE TEJADA I, GOLDSTEIN I & KRANE RJ. (1988) Local control of penile erection: nerves, smooth muscle and endothelium. In: Krane RJ (ed.), *Impotence. Urol Clin North Amer Philadelphia: WB Saunders Co.*, 15: 9-15.
- SATOH M, OGITA H, TAKESHITA K, MUKAI Y, KWIATKOWSKI DJ, LIAO JK. (2006) Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 9;103(19):7432-7.

- SATTAR AA, WESPES E, SCHULMAN CC. (1994) Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. **Eur Urol.**, (2):142-4.
- SAWYER DB, SIWIK DA, XIAO L, PIMENTEL DR, SINGH K, COLUCCI WS. (2002) Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. **J Mol Cell Cardiol.**, 34(4):379-88.
- SCHIFTER S, BREUM L, NICLASSEN B, VOLLMER-LARSEN A, RASMUSSEN HS, GRAFF-LARSEN O. (1995) Calcitonin gene-related peptide during exercise and training. **Horm Metab Res.** 27(10):473-5.
- SCHNACKENBERG CG, WILCOX CS. (1999) Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. **Hypertension.**, 33(1 Pt 2):424-8.
- SCHWARTZ M A, & LECHENE C. (1992) Adhesion is required for protein kinase C-dependent activation of the Na⁺/H⁺ antiporter by platelet-derived growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 89: 6138–6141.
- SCOTT WA. (2002) Maximizing performance and the prevention of injuries in competitive athletes. **Curr Sports Med Rep.**, 1(3):184-90.
- SESSA WC, PRITCHARD K, SEYEDI N, WANG J, HINTZE TH. (1994) Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circ Res.**, 74(2): 349-53.
- SHEN YT, YOUNG MA, OHANIAN J, GRAHAM RM, VATNER SF. (1990) Atrial natriuretic factor-induced systemic vasoconstriction in conscious dogs, rats, and monkeys. **Circ Res.**, 66(3): 647-61.
- SHISHEBOR MH, AVILES RJ, BRENNAN ML, FU X, GOORMASTIC M, PEARCE GL, GOKCE N, KEANEY JF JR, PENN MS, SPRECHER DL, VITA JA, HAZEN SL. (2003) Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. **JAMA.**, 289(13):1675-80.
- SIMONSEN U, PRIETO D, SANEZ DE TEJADA I & GARCIA-SACRISTAN A (1995) Involvement of nitric oxide in the non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission of horse deep penile arteries: role of charybdotoxin-sensitive K(+) -channels. **Br J Pharmacol**, **116**: 2582-2590.

- SIRKER A, ZHANG M, MURDOCH C, SHAH AM (2007) Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. **Am J Nephrol.**, 27(6):649-60.
- SIU PM, BRYNER RW, MARTYN JK, ALWAY SE. (2004) Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. **FASEB J.**, 18(10):1150-2.
- SULLIVAN ME, THOMPSON CS, DASHWOOD MR, KHAN MA, JEREMY JY, MORGAN RJ & MIKHAILIDIS DP. (1999) Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? **Cardiovasc. Res.**, 43: 658-665.
- TAKIMOTO E, KASS DA. (2007) Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. **Hypertension.**, 49(2):241-8.
- TANITO M, NAKAMURA H, KWON YW, TERATANI A, MASUTANI H, SHIOJI K, KISHIMOTO C, OHIRA A, HORIE R, YODOI J. (2004) Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. **Antioxid Redox Signal.**, 6(1):89-97.
- TEIXEIRA CE, BENTO AC, LOPES-MARTINS RA, TEIXEIRA SA, VON EICKESTEDT V, MUSCARA MN, ARANTES EC, GIGLIO JR, ANTUNES E, DE NUCCI G. (1998) Effect of Tityus serrulatus scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrenergic nerve fibres. **Br J Pharmacol.**, 123(3): 435-42.
- TIPTON CM, MATTHES RD, BEDFORD TG. (1982) Influence of training on the blood pressure changes during lower body negative pressure in rats. **Med Sci Sports Exerc.**, 14(1): 81-90.
- TOBLI JE, STELLA I, INSERRA F, FERDER L, ZELLER F, MAZZA ON. (2000) Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens.**, 13(6 Pt 1):686-92.
- TODA N, AYAJIKI K, OKAMURA T. (2005) Nitric oxide and penile erectile function. **Pharmacol Ther.**, 106(2): 233-66.

- TOUYZ RM. (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, 44(3):248-52.
- TRAISH AM, KIM NN, GOLDSTEIN I, MORELAND RB. (1999) Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. **J. Androl.**, 20(6): 671-82.
- TRAUB O, & BERK BC. (1998) Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, 18: 677– 685.
- TSENG H, PETERSON T E, & BERK BC. (1995) Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. **Circ Res.**, 77: 869– 878.
- TURKO IV, MURAD F. (2002) Protein nitration in cardiovascular diseases. **Pharmacol Rev.**, 54(4):619-34.
- UEMATSU M, OHARA Y, NAVAS JP, NISHIDA K, MURPHY TJ, ALEXANDER RW, NEREM RM, & HARRISON DG. (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. **Am J Physiol.**, 269: C1371– C1378.
- USHIYAMA M, MORITA T, KURAMOCHI T, YAGI S, KATAYAMA S. (2004) Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. **Hypertens Res.**, 27(4):253-61.
- VENDITTI P, MASULLO P, DI MEO S, AGNISOLA C. (2001) Effects of prolonged aerobic exercise on myocardial responses to ischaemia-reperfusion in the rat. **Exp Physiol.**, 341-8.
- WALSH PC, BRENDLER CB, CHANG T, MARSHALL FF, MOSTWIN JI, STUTZMAN R, SCHLEGEL PN. (1990) Preservation of sexual function in men during radical pelvic surgery. **Md Med J.**, (4):389-93.
- WANG R, DOMER FR, SIKKA SC, KADOWITZ PJ & HELLSTROM WJ (1994) Nitric oxide mediates penile erection in cats. *J Urol*, **151**: 234-237.

- WINGARD CJ, HUSAIN S, WILLIAMS J, JAMES S. (2003) RhoA-Rho kinase mediates synergistic ET-1 and phenylephrine contraction of rat corpus cavernosum. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 285(5):R1145-52.
- WOOD PD, STEFANICK ML, WILLIAMS PT, & HASKELL WL. (1991) The effects on plasma lipoproteins of a prudent weight-reducing diet, with or without exercise, in overweight men and women. **N Engl J Med.**, 325: 461– 466.
- XIAO DS, QIAN ZM. (2000) Plasma nitric oxide and iron concentration in exercise rats are negatively correlated. **Mol Cell Biochem.**, 208: 163-166.
- ZAGO AS, ZANESCO A. (2006) Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arq Bras Cardiol.**, 87(6):e264-70.
- ZATZ R. (1990) A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab. Anim. Sci.**, 40(2): 198-201.

ANEXO



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 763-1, sobre "INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE FÍSICA NA REATIVIDADE DO MÚSCULO LISO DO CORPO CAVERNOSO DO RATO EM DIFERENTES ESTADOS PATOLÓGICOS" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Edson Antunes / Mário Angelo Claudino está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 763-1, entitled "ROLE OF PHYSICAL ACTIVIT IN THE REACTIVIT OF CORPUS CAVERNOSUM SMOOTH MUSCLE FROM RATS WITH DIFFERENT PATHOLOGICAL STATES", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP