

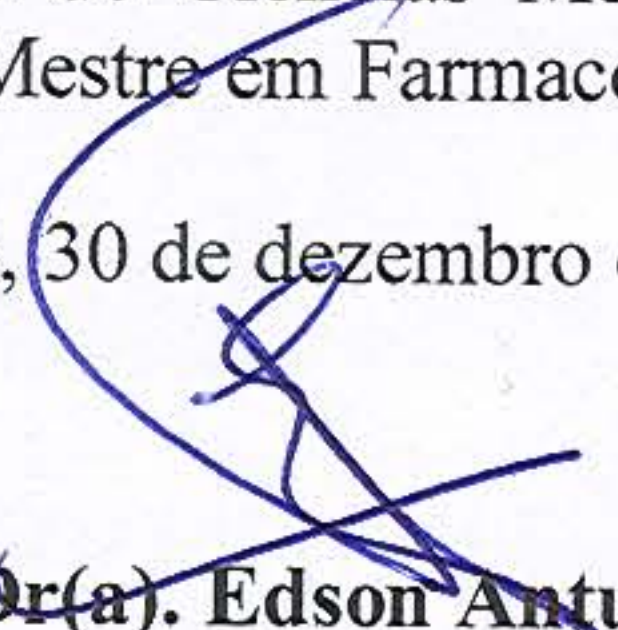
CLÉSIO BORGES PENA

**ASSOCIAÇÃO DE CARBONATO DE LODENAFIL
(HELLEVA) E TREINAMENTO FÍSICO NA EREÇÃO
PENIANA DE RATOS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, do aluno **Clésio Borges Pena**.

Campinas, 30 de dezembro de 2009.


Prof(a). Dr(a). Edson Antunes
Orientador(a)

CAMPINAS

2009

CLÉSIO BORGES PENA

***ASSOCIAÇÃO DE CARBONATO DE LODENAFIL
(HELLEVA) E TREINAMENTO FÍSICO NA EREÇÃO
PENIANA DE RATOS***

***Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação da faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.***

ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P38a Pena, Clésio Borges
 Associação de cabonato de lodenafil (Helleva) e treinamento físico
 na ereção peniana de ratos / Clésio Borges Pena. Campinas, SP :
 [s.n.], 2009.

Orientador : Edson Antunes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inibidores de fosfodiesterase. 2. Treinamento físico. 3.
Ereção peniana. I. Antunes, Edson. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Association of lodenafil carbonate and physical training
in the penile erection of rats**

Keywords: • Phosphodiesterase inhibitors
 • Physical training
 • Penile erection

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Edson Antunes
Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Brandão Lopes Martins
Prof. Dr. Stephen Hyslop

Data da defesa: 30-01-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Clésio Borges Pena

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Edson Antunes



Membros:

Professor (a) Doutor (a) **Rodrigo Alvaro Brandao Lopes Martins**



Professor (a) Doutor (a) **Stephen Hyslop**



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/01/2009

DEDICATÓRIA

Ao meu Senhor Jesus, amigo inseparável, criador dos céus e da terra. Criador e conhecedor de toda célula, toda enzima. A Ele dedico este trabalho, bem como toda minha vida.

A minha preciosa e linda família. A minha amada esposa Rosied, pela sua compreensão, apoio incondicional, e pelo estímulo. Aos meus preciosos filhos, Jônatas, Beatriz e Davi, vocês vieram do céu para alegrar a minha vida. A esta abençoada família que eu amo tanto. Vocês são maravilhosos.

Aos meus queridos pais, Lázaro e Eunice, e também aos meus maravilhosos irmãos, Claudomiro, Claudio, Glaucia, Cássio e Maria Helena. Apesar da distância, sinto o efeito de suas orações.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Edson Antunes,

*Agradeço imensamente pela oportunidade, por compartilhar comigo, parte de sua
experiência e conhecimento. E claro pela sua paciência.*

*Aos meus amigos que colocaram a mão na massa para que este trabalho pudesse ser
concluído.*

Fernanda Priviero e Haroldo Toque,

Agradeço pela ajuda fornecida, pelo tempo a mim dedicado, e é claro pela compreensão.

Aos meus amigos de laboratório Mario Claudino, Fabíola Monica, Fernando Baú, pela paciência e ajuda fornecida em vários momentos.

Agradeço a todos os amigos de laboratório com quem pude aprender, e dividir este tempo de trabalho. Foi um prazer trabalhar ao lado de pessoas dedicadas e competentes. Aos amigos da CASCATA, Camila Moraes, Fabio Ikeda, Fernanda Dell, Julio Rojas, Maria Andréia Delbin, Marlon Pereira, Rafael Annovazzi e Rodrigo Capel, por todos momentos que passamos juntos.

Agradeço em especial a Juliana Baracat por ter sido minha primeira professora dentro do laboratório.

Agradeço ao amigo Cleber Teixeira (in memoriam), que mesmo de uma forma indireta muito colaborou para realização destes experimentos.

Agradeço a todos meus amigos do Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Cristina Okuyama, Cristiane Freitas, Elen Landucci, Enilton Camargo, Fernanda e Marcelo Datti, Gláucia Mello, Ivani Souza, Juliana Moreira, Letícia Lintomen, Lineu Baldissera Jr., Marina Calixto, Nadia Mariano, Priscila Monteiro, Rafael Prada, Raquel Lorenzetti, Sara Thomazzi, Profa. Sisi Marcondes, Tatiane Ferreira, agradeço por toda a amizade e pela alegria compartilhada no dia-a-dia de trabalho.

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, que se mostra muito rápido e eficaz em seu trabalho. Elaine, Fran, Bruna, Toninho, Guina, José Hilton, e Adilson, pela agradável convivência e pelos serviços prestados.

Ao Gêdo, pela amizade e ajuda no modelo experimental.

Ao meu sogro, senhor Piazza, que muito tem me ajudado. Aos meus cunhados Josefite e Raquel pelo apoio.

Aos meus amigos da Farmácia de Genérico de Araras, sem o apoio e dedicação de vocês no trabalho, não seria possível meus dias de experimentos na Unicamp.

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

*"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus.
Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem
compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço
claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."
(Galileu Galilei)*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
LISTA DE MATERIAIS E DROGAS.....	xviii
LISTA DE FIGURAS.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xx
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. ANATOMIA DA EREÇÃO PENIANA.....	28
1.1.1. <i>Neuroanatomia Peniana: Vias periféricas</i>	29
1.1.2. <i>Neuroanatomia Peniana: Vias autonômicas</i>	29
1.1.3. <i>Neuroanatomia Peniana: Vias somáticas</i>	29
1.2. MECANISMO FISIOLÓGICO DA EREÇÃO PENIANA.....	31
1.3. IMPORTÂNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NA EREÇÃO PENIANA.....	33
1.4. FOSFODIESTERASES.....	35
1.5. INIBIDORES DA FOSFODIESTERASE 5.....	36
1.6. CARBONATO DE LODENAFIL.....	38
1.7. ATIVIDADE FÍSICA E SEUS EFEITOS BENÉFICOS.....	40
1.8. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	42
OBJETIVOS.....	43
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1. ANIMAIS.....	46
2.2. PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO.....	46
2.3. INIBIÇÃO CRÔNICA DO ÓXIDO NÍTRICO (L-NAME).....	47
2.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	48
2.5. MONITORAMENTO DA PRESSÃO INTRACAVERNOSA EM RATOS	
ANESTESIADOS	49
2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3. RESULTADOS.....	51
3.1. EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO.....	52
3.1.1. <i>Peso corporal</i>	52
3.1.2. <i>Pressão arterial média</i>	53

3.1.3 Medida da pressão intracavernosa.....	54
3.2. EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO NA FUNÇÃO ERÉTIL DE RATOS SUBMENTIDOS AO BLOQUEIO CRÔNICO DE ÓXIDO NÍTRICO	56
3.2.1. <i>Peso corporal</i>	56
3.2.2. <i>Pressão arterial de ratos tratados com L-NAME</i>	57
3.2.3. <i>Pressão intracavernosa de ratos tratados com L-NAME</i>	58
3.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO CARBONATO DE LODENAFIL NO AUMENTO DA PRESSÃO INTRACAVERNOSA DE RATO <i>IN VIVO</i>	59
3.3.1. <i>Ratos sedentários</i>	59
3.3.2. <i>Ratos treinados</i>	61
3.4. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO CARBONATO DE LODENAFIL EM RATOS TRATADOS COM L-NAME 3.4.1 <i>Ratos sedentários</i>	63
3.4.2 <i>Ratos treinados</i>	64
4. DISCUSSÃO	65
5. SUMÁRIO	71
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	serotonina
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	íon cálcio
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
C-SD	controle sedentário
C-TR	controle treinado
EFS	estimulação elétrica
E _{max}	resposta máxima
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
GCs	guanilato ciclase solúvel
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
ICP	Pressão intracavernosa
IP ₃	trifosfato de inositol
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
NANC	não adrenérgico não colinérgico
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
PAM	Pressão arterial média
PDE	fosfodiesterase
PKG	proteína kinase G
ROS	espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido dismutase
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
VO _{2máx}	volume máximo de oxigênio

LISTA DE MATERIAIS

CARBONATO DE LODENAFIL	LAB. CRISTÁLIA (Itapira-SP, Brasil)
URETANA	SIGMA (St. Louis, Mo, EUA)
L-NAME	SIGMA (St. Louis, Mo, EUA)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo hipotético da ereção peniana.

Figura 2. Estrutura química dos inibidores de PDE5 comercializados para o tratamento da disfunção erétil.

Figura 3. Estrutura química do Carbonato de Lodenafil.

Figura 4. Pressão arterial média.

Figura 5. Representação gráfica da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico.

Figura 6. Efeito da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico.

Figura 7. Pressão arterial.

Figura 8. Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso.

Figura 9. Representação gráfica da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico.

Figura 10. Efeito da administração endovenosa do carbonato de lodenafil.

Figura 11. Representação gráfica da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico

Figura 12. Efeito da administração endovenosa do carbonato de lodenafil.

Figura 13. Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso de ratos.

Figura 14. Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso de ratos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso corporal dos ratos estudados.

Tabela 2. Peso corporal dos ratos tratados ou não com L-NAME.

RESUMO

A ereção peniana envolve a interação da estimulação neural do músculo liso do corpo cavernoso bem como liberação neuro-humoral de fatores contráteis e relaxantes do endotélio. A cascata de sinalização óxido nítrico (NO)/(GMPc) é o evento mais importante e efetivo no mecanismo de ereção peniana. Nesta última década, diversos inibidores de fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) foram desenvolvidos e aprovados para o tratamento da disfunção erétil. Estes fármacos atuam inibindo a ação da PDE5 sobre o GMPc, que modula respostas fisiológicas em vários tecidos, como o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso. Dentre os inibidores de PDE5, são atualmente comercializados o sildenafil, tadalafil, vardenafil e o carbonato de lodenafil, sendo este último sintetizado no Brasil. Os objetivos deste trabalho foram: 1. Avaliar a eficácia do carbonato de lodenafil na função erétil de ratos, usando a técnica de pressão intracavernosa (ICP); 2. Avaliar o possível sinergismo entre o treinamento físico e o inibidor de PDE5 carbonato de lodenafil; e 3. Avaliar o efeito do carbonato de lodenafil, isoladamente, ou em associação com o treinamento físico na ICP de ratos submetidos (ou não) ao tratamento crônico com L-NAME. Ratos Wistar machos foram anestesiados com uretana (1,2 g/ Kg) por via intraperitoneal. A seguir foi realizada uma traqueostomia para facilitar a respiração do animal, e a artéria carótida foi canulada para o monitoramento contínuo da pressão arterial média (MAP). Uma cânula provida de agulha foi inserida no corpo cavernoso esquerdo para registro da ICP, usando-se transdutores de pressão. 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 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 pressão foram registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados. A administração da droga foi realizada pela veia jugular. O treinamento físico teve duração de oito semanas, em sessões de uma hora por dia, cinco dias por semana. O grupo que recebeu L-NAME fez um treinamento físico preventivo de quatro semanas, e no início da quinta semana o L-NAME passou a ser administrado na dose aproximada de 10 mg/rato/dia, durante 4 semanas. Observamos que o treinamento físico em animais normotensos não alterou a pressão arterial média nem a pressão intracavernosa. O tratamento crônico com L-NAME aumentou a pressão arterial média nos animais sedentários. No entanto, este aumento foi atenuado nos animais submetidos ao treinamento físico. O L-NAME aboliu a resposta erétil (valores de ICP) nos animais sedentários. O treinamento físico não foi capaz de prevenir ou atenuar a queda da pressão intracavernosa induzida pelo L-NAME. O carbonato de lodenafil se mostrou eficaz em promover aumento da pressão intracavernosa tanto em animais sedentários bem como em treinados, no entanto, não houve sinergismo entre o treinamento físico e o carbonato de lodenafil. Adicionalmente, a associação entre treinamento físico e carbonato de lodenafil não foi eficaz em restaurar os valores de ICP em animais tratados com L-NAME.

ABSTRACT

Penile erection involves an interaction between neural stimulation of the corpus cavernosum smooth muscle and neurohumoral contractile and relaxing factors released from the endothelium. The nitric oxide (NO)/cGMP pathway is the most important and effective mechanism of penile erection. In the last decade, phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitors were developed and approved for treating erectile dysfunction. These compounds inhibit the PDE5, which deactivates the cGMP, responsible by several physiological responses in many tissues, such as the relaxation of the corpus cavernosum smooth muscle. To date, 4 PDE5 inhibitors are commercially available, sildenafil, tadalafil, vardenafil and lodenafil carbonate, the last one being synthesized in Brazil. The aim of this work was: 1) to evaluate the efficacy of lodenafil carbonate in rat erectile function, measured by the intracavernous pressure (ICP); 2) to evaluate whether the erectile responses of lodenafil carbonate are potentiated in exercised rats; and 3) to evaluate the effects of lodenafil carbonate, only, or associated to physical exercise in the ICP, in rats submitted (or not) to chronic treatment with L-NAME. Male Wistar rats were anesthetized with urethane (1.2 g/Kg, i.p.). It was performed a tracheotomy to allow the animal to breath, and the carotid artery was cannulated to continuously measure the mean arterial pressure (MAP). A needle coupled to a cannula was inserted in the left corpus cavernosum to measure ICP. The abdominal cavity was open and the cavernous nerve was exposed. A platinum bipolar electrode was placed on the cavernous nerve and connected to an electric stimulator. Electrical field stimulation of the cavernous nerve (pulses of 1 ms, 45 s, 6 V) under different frequencies (2, 4, 6, 8 e 10 Hz) were applied. Changes in the MAP and ICP were registered in a Powerlab™ data acquisition system. Drugs were administered via jugular vein. The physical training program consisted in 60 min/day of running, 5 days/week and

lasted eight weeks. In the group exercised which received L-NAME (10 mg/rat/day), L-NAME administration started after the fourth week of training, during 4 weeks further. We observed that the physical training did not alter MAP and ICP in normotensive rats. Chronic L-NAME administration increased the MAP in sedentary rats. However, this increase was attenuated in trained rats. L-NAME administration blunted the increase in the ICP in sedentary rats and exercise was not able to prevent or attenuate this decrease in the ICP induced by L-NAME. Lodenafil carbonate was efficient in promote an increase in the ICP in both sedentary and trained animal. However, there was no synergism between lodenafil carbonate and exercise in producing increase in the ICP. Additionally, association between exercise and lodenafil carbonate was not able to restore the ICP in L-NAME-treated animal.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia da Ereção Peniana

A anatomia geral do pênis é semelhante em todas as espécies de mamíferos. O pênis humano consiste de três segmentos cilíndricos: os corpos cavernosos pareados localizados na parte dorsal e o corpo esponjoso na parte ventral, o qual circunda a uretra e forma a 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 das lacunas e consistem de bandas espessas de músculo liso e de uma estrutura fibroelástica formada por fibroblastos, colágeno e elastina (Krane *et al.*, 1989). Os corpos cavernosos são divididos por um septo perfurado, incompleto no humano, que os permite funcionar como uma unidade. Alguns mamíferos, como o cão, apresentam uma formação óssea na região do septo (osso peniano).

A túnica albugínea dos corpos cavernosos apresenta uma espessura de 2-3 mm no estado flácido (Bitsch *et al.*, 1990). A túnica albugínea do corpo esponjoso é menos densa do que a dos corpos cavernosos e contém mais fibras elásticas. A parte proximal do pênis encontra-se ancorada ao osso pélvico, sendo esta região denominada crura dos corpos cavernosos, enquanto a parte proximal do corpo esponjoso forma o bulbo peniano. Tanto a crura quanto o bulbo estão conectados aos músculos estriados. O bulbo peniano está circundado pelo músculo bulbocavernoso (ou bulboesponjoso), ao passo que a crura peniana está circundada pelo músculo isquiocavernoso. A glândula peniana apresenta uma

aparência de esponja devido a um vasto plexo venoso com um grande número de anastomoses.

1.1.1. Neuroanatomia Peniana: Vias Periféricas

A inervação do trato urogenital é autonômica (vias simpáticas e parassimpáticas) e somática (vias sensoriais e motoras). A partir da coluna espinhal e dos gânglios periféricos, a inervação simpática e parassimpática confluem, formando assim o nervo cavernoso, que adentra o corpo cavernoso e o corpo esponjoso para efetuar os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescencia. Os nervos somáticos são responsáveis pelas sensações e pela contração dos músculos bulbocavernosos e isquiocavernosos (Dean & Lue, 2005).

1.1.2. Neuroanatomia Peniana: Vias Autonômicas

A via simpática se origina dos segmentos espinhais 11º toraxico e 2º lombar e passa através do ramo branco para a cadeia ganglionar simpática. Algumas fibras se dirigem através dos nervos esplênicos para os plexos hipogástricos superior e mesentérico inferior de onde partem através do nervo hipogástrico em direção ao plexo pélvico (Dean & Lue, 2005).

A via parassimpática surge de neurônios localizados do 2º ao 4º segmentos sacrais. As fibras pré-ganglionares passam do nervo onde se unem às fibras simpáticas do plexo hipogástrico superior pélvico para o plexo pélvico. Os nervos cavernosos então se ramificam do plexo pélvico em direção ao pênis. Estimulação do plexo pélvico e do

nervo cavernoso induz ereção, enquanto que a estimulação do tronco simpático causa detumescência.

1.1.3. Neuroanatomia Peniana: Vias Somáticas

A via somatosensorial se origina de receptores sensoriais localizados na pele do pênis, glândula, uretra e no interior do corpo cavernoso. Na glândula do pênis humano há numerosas terminações aferentes: terminações nervosas livres e receptores corpusculares em uma razão de 10:1. As terminações nervosas livres são divididas em mielinizadas e não mielinizadas e são diferentes de qualquer outra área cutânea do corpo. As fibras nervosas convergem para o nervo dorsal do pênis que se unem a outros nervos formando o nervo pudendo. Este último adentra a coluna espinhal via S2-S4 para terminar nos neurônios espinhais e interneurônios na região cinzenta central do segmento lombosacral. A ativação destes nervos sensoriais envia mensagens de dor, temperatura e toque pelas vias espinotalâmica e espinoreticular para o tálamo e córtex sensorial desencadeando a percepção sensorial (Dean & Lue, 2005; Burnett *et al.*, 1993).

O núcleo de Onuf no 2º ao 4º segmento sacral é o centro de inervação peniana somatomotora. Estes nervos se dirigem através dos nervos sacrais para o nervo pudendo para inervar os músculos ísquio e bulbo cavernosos. A contração do músculo isquiocavernoso participa da fase rígida da ereção. A contração rítmica do músculo bulbo cavernoso é necessária para a ejaculação (Dean & Lue, 2005).

1.2. Mecanismo fisiológico da ereção peniana

Durante a ereção, o pênis atua como um capacitor, acumulando sangue sob pressão devido ao relaxamento dos corpos cavernosos (Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Aboseif & Lue, 1988; Lue & Tanagho, 1987; Saenz de Tejada *et al.*, 1991). Durante o estado flácido, as arteríolas e os sinusóides estão contraídos, principalmente através de mecanismos α -adrenérgicos (Traish *et al.*, 1999), e

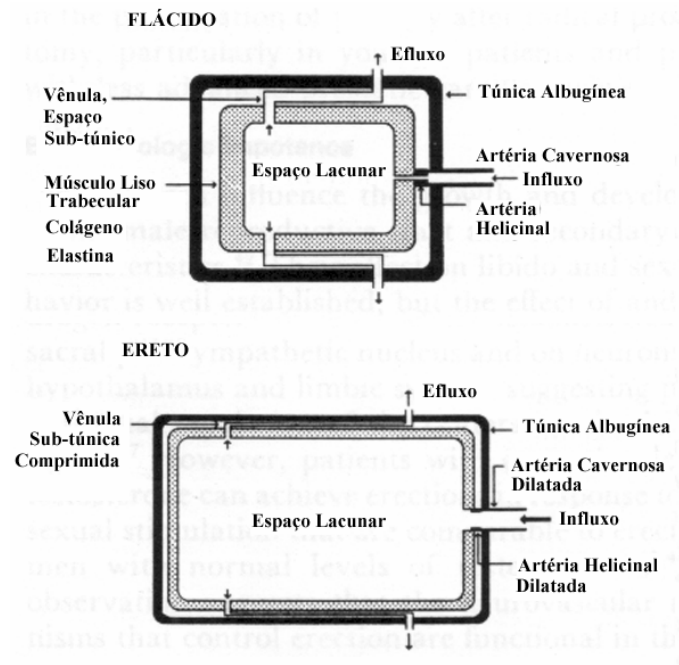


Figura 1: Mecanismo hipotético da ereção peniana.

exercem resistência máxima ao influxo arterial; neste estado, apenas pequena percentagem de sangue adentra os corpos cavernosos com propósitos nutricionais (Figura 1). Ao mesmo tempo em que sinusóides estão contraídos, as veias drenam livremente para veias extra-penianas. Assim, durante este 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, e apresentam PO_2 de 20 a 40 mmHg quando o pênis encontra-se no estado flácido (Kim *et al.*, 1993). Quando o bloqueio da atividade simpática se instala, essas musculaturas relaxam (tumescência) permitindo o influxo arterial e, conseqüentemente, o aumento progressivo da pressão sangüínea intracavernosa. Apenas

o bloqueio da atividade adrenérgica não é suficiente para que seja alcançado o estado de ereção peniana total. Os principais eventos responsáveis pelo estado de ereção total são o relaxamento da musculatura lisa cavernosa e artérias helicinais, quando ocorre então expansão máxima dos espaços lacunares que terminam por comprimir os plexos venosos sub-albugíneos.

Durante a ereção, os músculos lisos de arteríolas e sinusóides relaxam, conseqüentemente reduzindo a resistência periférica. Assim, a dilatação das artérias cavernosa e helicinal levam ao aumento do fluxo sangüíneo nos espaços lacunares, e o relaxamento do músculo liso trabecular dilata os espaços lacunares, causando expansão do pênis. O influxo de sangue arterial está associado com aumento na PO_2 (90-100 mmHg) durante o desenvolvimento do estado de tumescência (Kim *et al.*, 1993). A pressão sangüínea sistêmica transmitida através das arteríolas helicinais dilatadas expande o músculo liso trabecular contra a túnica albugínea. Este evento comprime o plexo de vênulas sub-túnicas e reduz o efluxo venoso no espaço lacunar e, dessa forma, o pênis é mantido rígido (Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Lue & Tanagho, 1987; Lue & Tanagho, 1988; Krane *et al.*, 1989). A pressão no espaço lacunar durante a ereção é resultado do equilíbrio entre a pressão de perfusão na artéria cavernosa e a resistência ao efluxo sangüíneo pelas vênulas sub-túnicas comprimidas. A redução do efluxo venoso pela compressão mecânica das vênulas sub-túnicas é conhecida como mecanismo de oclusão venosa (Shirai *et al.*, 1978), que leva ao aumento na pressão intracavernosa a um valor próximo da pressão sistêmica arterial média (Aboseif & Lue, 1988; Lue & Tanagho, 1987).

A ativação de nervos constritores simpáticos causa um aumento do *tônus* muscular das artérias helicinais e das trabéculas. Isto resulta na redução do influxo arterial e diminuição dos espaços lacunares, com descompressão das vênulas sub-túnicas e aumento do efluxo sangüíneo dos espaços lacunares, promovendo o retorno do pênis ao estado flácido (Lue & Tanagho, 1988; Saenz de Tejada *et al.*, 1985; Lue & Tanagho, 1987; Krane *et al.*, 1989). Os eventos hemodinâmicos que ocorrem durante ereção e detumescência requerem alterações coordenadas do fluxo sangüíneo, pressão intracavernosa e volume peniano (Andersson & Wagner, 1995; Azadzo *et al.*, 1995).

1.3. Importância do óxido nítrico na ereção peniana

É bem estabelecido que o processo de ereção peniana envolve mecanismos não-adrenérgicos não-colinérgicos (NANC; Andersson & Wagner, 1995). Diversos mediadores foram propostos como responsáveis pelas respostas mediadas pelo sistema NANC, como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P, adenosina, ATP, aminoácidos descarboxilados, histamina, serotonina (5-HT), prostaglandinas e bradicinina. Entretanto, o óxido nítrico (NO) é hoje aceito como principal neurotransmissor NANC responsável pela ereção peniana (Kim *et al.*, 1993; Burnett *et al.*, 1992). Esta substância, liberada de terminações nervosas NANC e do endotélio dos capilares sinusoidais, promove o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso e do músculo liso trabecular do pênis por mecanismo dependente de GMPc (Ignarro *et al.*, 1990; Rajfer *et al.*, 1992).

O papel do NO como principal mediador da ereção peniana foi relatado há mais de uma década, quando diversos estudos *in vitro* mostraram que inibidores da NO sintase

(NOS) têm a capacidade de bloquear o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso provocado por estimulação elétrica em várias espécies, como coelho (Ignarro *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1991), cão (Hayashida *et al.*, 1996; Ayajiki *et al.*, 1999), cavalo (Recio *et al.*, 1998), macaco (Okamura *et al.*, 1998), rato (Hedlund *et al.*, 1999), camundongo (Mizusawa *et al.*, 2001) e humanos (Holmquist *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1991; Pickard *et al.*, 1991; Holmquist *et al.*, 1992; Kirkeby *et al.*, 1993; Leone *et al.*, 1994). Após a estimulação elétrica do corpo cavernoso, observam-se níveis aumentados de nitritos, nitratos e citrulina no coelho e humanos (Ignarro *et al.*, 1990; Bush *et al.*, 1992; Leone *et al.*, 1994). O NO, bem como doadores de NO, relaxam preparações de tecido erétil de humanos e coelhos (Bush *et al.*, 1992; Rajfer *et al.*, 1992; Holmquist *et al.*, 1993; Christ *et al.*, 1995) e causa tumescência em cães, gatos, macacos e humanos (Wang *et al.*, 1994; Hellstrom *et al.*, 1994). A estimulação direta do endotélio pela acetilcolina representa um mecanismo alternativo para a liberação de NO no pênis (Blanco *et al.*, 1988; Knispel *et al.*, 1991).

A ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) pelo NO causa elevação nos níveis de GMPc, que é formado a partir do GTP e posteriormente metabolizado para GMP (Evgenov *et al.*, 2006). Inibidores da GCs são capazes de inibir os relaxamentos de corpo cavernoso induzidos por estimulação elétrica, bem como aqueles evocados por agentes que atuam de maneira dependente (acetilcolina) ou independente do endotélio (NO autêntico e doadores de NO), confirmando o envolvimento do GMPc nos relaxamentos de corpo cavernoso mediados pelo NO em várias espécies (Ignarro *et al.*, 1990; Hedlund *et al.*, 1999; Mizusawa *et al.*, 2001).

O GMPc induz relaxamento no músculo liso por dessensibilização ao aparato contrátil para o Ca^{2+} e por diminuição da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Desta forma, o GMPc poderia afetar a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por quatro vias diferentes: 1) redução da entrada e aumento de saída de Ca^{2+} ; 2) ativação da bomba $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ e trocas de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; 3) aumento de seqüestro de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático (RS); 4) diminuição na mobilidade de Ca^{2+} através da inibição do receptor IP_3 (trifosfato de inositol) no retículo sarcoplasmático. O GMPc é rapidamente inativado e convertido a 5'GMP pela atividade dos nucleotídeos cíclicos das fosfodiesterases. Entretanto, a concentração de GMPc no músculo liso vascular depende principalmente do balanço entre a produção de GMPc pela GCs e a degradação deste pela PDE, que representa a única via de metabolismo para este segundo mensageiro (Maurice *et al.*, 2003; Rybalkin *et al.*, 2003).

1.4. Fosfodiesterases (PDEs)

As fosfodiesterases (PDEs), enzimas que têm como principal função celular finalizar o sinal deflagrado pelos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc, controlam o grau de hidrólise destes nucleotídeos, catalisando a reação de hidrólise da união do 3-fosfoéster sobre o AMPc ou GMPc (Beavo, 1995). Isto transforma estes segundos-mensageiros em seus metabólitos inativos, os nucleotídeos 5'-AMP ou 5'-GMP (Texeira *et al.*, 1997; Torphy, 1998). As PDEs são homodiméricas, cada subunidade composta por 99 KDa, e apresentam em sua estrutura 3 domínios funcionais: (1) um domínio catalítico; (2) uma região N-terminal e (3) uma região C terminal. Todas as PDEs mostram similaridades em seus domínios catalíticos porem diferem muito na região N-terminal, a qual contem diferentes tipos de domínios regulatórios (Rybalkin *et al.*, 2003).

Atualmente, há onze famílias de PDEs descritas as quais variam de acordo com a sequência homológica e propriedades bioquímicas (Soderling & Beavo, 2000; Cote, 2004). Todas as PDEs são sensíveis a inibidores e encontram-se distribuídos em diferentes tecidos vasculares. As PDEs que degradam especificamente o GMPc são: PDE5, PDE6 e PDE9; as que degradam o AMPc são: PDE4, PDE7 e PDE8; e as que degradam tanto AMPc como GMPc são: PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11 (Rybalkin *et al.*, 2003).

1.5. Inibidores de Fosfodiesterase 5 (PDE5)

A PDE5, enzima seletiva para GMPc, encontra-se amplamente distribuída no músculo liso vascular e não vascular, plaquetas, rins, pulmões e no corpo cavernoso, e se caracteriza por controlar a via de sinalização do GMPc/PKG, especialmente em baixas concentrações de cálcio (Rybalkin *et al.*, 2003). Esta PDE é a principal isoforma responsável pela degradação de GMPc no corpo cavernoso (Corbin *et al.*, 2004; Ballard *et al.*, 1998), causando aumento dos níveis de GMPc, que resulta em relaxamento do músculo liso, influxo de sangue no tecido erétil e ereção peniana.

Atualmente, a principal terapia para a disfunção erétil envolve tratamento oral com inibidores de PDE5 (Corbin *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 1998). O sildenafil, medicamento cujo objetivo era para o tratamento da angina de peito, foi aprovado pela *Food Drug Administration* (FDA) para o tratamento oral da disfunção erétil (Ballard *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 1998). O mecanismo de ação dos inibidores de PDE5 envolve inibição da hidrólise catalítica do GMPc intracelular, promovendo acúmulo dos níveis de GMPc intracelulares, facilitando o relaxamento vascular e conseqüentemente a ereção do pênis. Além do sildenafil, o FDA aprovou em 2003 dois novos inibidores de PDE5, o

varденафил (LevitraTM) e o тадалафил (CialisTM) para ser administrados por via oral para o tratamento da disfunção erétil. Estes três inibidores apresentam estrutura muito similar ao GMPc e competem com o substrato pelo sitio catalítico da enzima. Estas três moléculas apresentam um sistema de anel duplo heterocíclico nitrogenado, simulando a base purina do GMPc o qual interagem no mesmo sítio catalítico da PDE5. Efeitos colaterais como cefaléia, rubor facial, congestão nasal, dispepsia e transtornos visuais têm sido relacionados ao uso destes três inibidores da PDE5. Embora alguns destes efeitos secundários, como deficiência visual, tenham sido atribuídos à inibição da PDE6, dados recentes mostram que a retina humana contém isoformas tanto da PDE5 como da PDE6 (Foresta *et al.*, 2008).

Atualmente, continua-se investigando o desenvolvimento de novas moléculas com características mais potentes e seletivas em inibir a PDE5 (Flores Toque *et al.*, 2008) advém da possibilidade de aliviar os efeitos adversos do sildenafil. Recentemente, o Udenafil e o carbonato de Iodenafil (Helleva) foram relatados como novos inibidores de PDE5 (Ji *et al.*, 2007; Toque *et al.*, 2008).

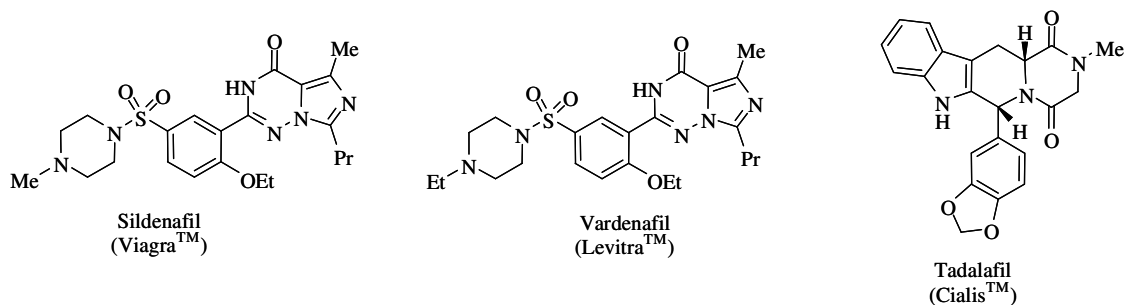


Figura 2. Estrutura química dos inibidores de PDE5 comercializados para o tratamento da disfunção erétil.

1.6. Carbonato de Lodenafil (Helleva)

O carbonato de lodenafil, sintetizado pelo Laboratório Cristália, foi aprovado para o tratamento oral da disfunção erétil (Toque et al., 2008). Este composto é uma pró-droga, apresentada como um dímero que é cindido no organismo, liberando seu metabólito ativo, o lodenafil, um inibidor seletivo para a PDE5. A Figura 3 mostra a estrutura molecular do lodenafil. A inibição da PDE5 pelo lodenafil previne a degradação deste nucleotídeo promovendo a ereção através de três eventos: (i) aumento do influxo arterial para o pênis; (ii) relaxamento do músculo liso cavernoso com enchimento dos espaços sinusoidais; (iii) restrição do retorno venoso que leva à oclusão venosa no tecido erétil. Estes efeitos resultam na melhora da ereção peniana em indivíduos com disfunção erétil.

Estudos *in vitro* demonstraram que o carbonato de lodenafil apresenta um efeito similar ao lodenafil ou sildenafil em relaxar o corpo cavernoso de coelho (valores de concentração (EC_{50}) de 0,29, 0,28 e 0,25 μ M, para carbonato de lodenafil, lodenafil e sildenafil, respectivamente), porém com maior valor de EC_{50} que o lodenafil ou sildenafil em corpo cavernoso humano (1,09 μ M para carbonato de lodenafil, 0,37 μ M para o lodenafil e 0,49 μ M para o sildenafil, respectivamente). Além disso, estudos farmacocinéticos do carbonato de lodenafil mostraram que após administração oral e intravascular em cães, o lodenafil e o norlodenafil são detectados na circulação sistêmica, mas pouca quantidade de carbonato de lodenafil (Toque *et al.*, 2008). Uma possível explicação que os autores deram é que o carbonato de lodenafil estaria atuando como pró-droga, sendo o lodenafil a molécula ativa do carbonato de lodenafil.

As propriedades farmacocinéticas são dependentes da concentração e os efeitos colaterais do carbonato de lodenafil estão relacionados à inibição de outras PDEs como a

cefaléia, o rubor facial, distúrbios visuais, rinite, tontura, dor lombar e outros. É metabolizado pela citocromo 450, especificamente pelas isoformas 3A4 e 2C9, e inibidores destas isoformas podem retardar o metabolismo do carbonato de lodenafil.

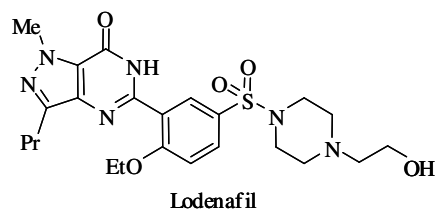


Figura 3. Estrutura química do carbonato de lodenafil (*Helleva*) e seu metabólito ativo o Lodenafil.

1.7. Atividade Física e seus Efeitos Benéficos

Os efeitos benéficos do exercício físico têm sido descritos em diversos estudos em humanos, quanto em modelos animais. Os exercícios aeróbios são descritos como os mais eficientes como terapia alternativa ou concomitante com terapia farmacológica para o tratamento de hipertensão arterial leve ou moderada. Estudos diversos mostram que a atividade física aeróbia diária previne a morbidade e mortalidade de doenças cardiovasculares (Paffenger *et al.*, 1993; Castelli, 1984), ajuda em manter o controle da pressão arterial de ratos espontaneamente hipertensos (Horta *et al.*, 2005) e promove uma melhora na função erétil de ratos hipertensos (Claudino *et al.*, 2007). No entanto, grande variabilidade existe em cada estudo com relação ao volume de treinamento, envolvendo a intensidade (carga do trabalho), a frequência (dias por semana) e a duração das sessões (tempo de cada treinamento). Exercícios aeróbios como atletismo, natação, ciclismo, caminhada, subir e descer escadas são os que desencadeiam melhores resultados na redução da pressão arterial (Franklin *et al.*, 1991). Os programas de treinamento físico preconizam que os exercícios devem ser realizados de três a cinco sessões por semana, com duração de 30 a 60 minutos e com intensidade de 50 a 85% do consumo Máximo de oxigênio (VO_2 max). A interação entre a intensidade, frequência e a duração determinam o dispêndio calórico, a melhora na capacidade de utilização do oxigênio, ou redução de riscos de doenças crônicas (ACSM, 2000). É importante salientar que toda a prescrição do exercício depende da condição inicial e da progressão de cada indivíduo dentro do protocolo escolhido. Estudos mostram que os exercícios de intensidade moderada (50 a 70% VO_2 max) são suficientes em produzir benefícios na melhora do perfil lipídico e da pressão arterial (Banz *et al.*, 2003; Couillard *et al.*, 2001).

Sabe-se que o exercício físico aumenta o fluxo sanguíneo pulsátil e que a pressão que o sangue exerce sobre a parede vascular e a tensão de cisalhamento (shear stress) sob as células endoteliais são estímulos poderosos para a geração de NO, no sistema vascular. Os mecanismos moleculares pelos quais o shear stress provoca maior atividade da enzima eNOS e conseqüentemente aumento na produção de NO são complexos e envolvem diversas vias de sinalização dentro da célula endotelial (Cooper *et al.*, 2002). Acredita-se que os mecanorreceptores tais como a caveolina (Garcia-Cardenas *et al.*, 1998), as proteínas G (Tseng *et al.*, 1995), os canais iônicos (Schwart & Lechene, 1992) e as integrinas (Muller *et al.*, 1997) captam as alterações de tensão sobre a parede celular e convertem os estímulos mecânicos em estímulos químicos para a ativação da eNOS (Kojda & Hambrecht, 2005).

Além disso, o shear-stress estimula o endotélio, aumentando o transporte do aminoácido L-arginina os níveis de Ca^{2+} intracelulares, a atividade e a expressão da NOS e a produção da superóxido dismutase (SODs), promovendo maior disponibilidade de NO para os tecidos (Takimoto & Kass, 2007). As SODs e outros antioxidantes (glutathione peroxidase e catalase) são moléculas capazes de remover os radicais livres, prevenindo danos celulares mediados por radicais livres (Scott *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstraram que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) está associado com problemas de disfunção erétil em modelos patológicos como a síndrome metabólica (Traish *et al.*, 2008), hipercolesterolemia e hipertensão arterial (Jin *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2005). Este aumento de ROS reduz a biodisponibilidade de NO, piorando a função endotelial e atividade erétil (Burnett *et al.*, 2006).

1.8. Justificativa e Relevância

Os inibidores de PDE5 como o sildenafil, tadalafil e vardenafil foram os primeiros compostos usados para o tratamento da disfunção erétil administrados por via oral. Recentemente, o laboratório Cristália sintetizou um novo inibidor de PDE5, o carbonato de lodenafil (Helleva), utilizado para o tratamento da disfunção erétil. Estudos prévios realizados no nosso laboratório mostraram que o carbonato de lodenafil apresenta características similares ao sildenafil tanto *in vivo* como *in vitro* (Toque *et al.*, 2008).

A atividade física regular tem sido recomendada como terapia não farmacológica na prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares como a síndrome metabólica, hipertensão leve ou moderada. Devido à disfunção erétil estar estreitamente relacionada a doenças cardiovasculares, visamos avaliar a influência do treinamento físico na atividade erétil de ratos saudáveis e submetidos a bloqueio crônico de NO.

Devido ao potencial terapêutico do carbonato de lodenafil na disfunção erétil, este projeto visou avaliar os possíveis efeitos benéficos do treinamento físico regular na função erétil de animais saudáveis ou sob estados patológicos (deficiência crônica de NO). Desta forma, este trabalho avaliou a pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico *in vivo* na presença e na ausência do inibidor de PDE5 em ratos normotensos e hipertensos (induzida pelo L-NAME).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar o efeito do carbonato de lodenafil (Helleva) na ereção peniana de ratos normotensos e hipertensos submetidos ao treinamento físico.
- Avaliar a influência do treinamento físico na função erétil de ratos normotensos e hipertensos submetidos ao bloqueio crônico de óxido nítrico (L-NAME).

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram usados ratos Wistar machos entre 14 e 16 semanas de vida, pesando entre 250 e 400g, provenientes do Centro disciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB – UNICAMP, Campinas, SP). Os ratos ficaram alojados ao menos uma semana no biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia – UNICAMP, mantidos em ciclo claro/escuro (12h/12h), a uma temperatura de 25°C, em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os protocolos realizados tiveram a aprovação prévia da Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolo CEEA_IB/UNICAMP 984-1).

2.2. Programa de treinamento físico: corrida em esteira

Na primeira semana de estudo, todos os animais foram submetidos a um período de adaptação à esteira que consistia em manter os animais na esteira em velocidades variando entre de 0,3 no primeiro dia até 0,6 km/h no quinto dia da semana. Progressões de tempo na duração das sessões também foram realizadas até que os animais conseguissem permanecer correndo na esteira por 60 minutos. Durante o período de adaptação alguns animais foram excluídos porque em nenhum momento realizaram o exercício. Após este período, somente os animais “corredores” foram submetidos ao treinamento físico que foi iniciado com uma velocidade de 0,6 Km/h na primeira sessão, aumentando progressivamente conforme a evolução do grupo de animais, até a segunda semana onde se atingia a velocidade final entre 0,9 e 1,2 Km/h, o que corresponde 66% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) segundo Priviero *et al.*, (2001). As sessões

foram realizadas em uma 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. E foram realizadas durante uma hora por dia, cinco dias por semana, durante oito semanas.

2.3. Inibição crônica de óxido nítrico (L-NAME)

O tratamento crônico com L-NAME foi conduzido de acordo com Ribeiro *et al.* (1992). O N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foi dissolvido em água (100 mg/L) e oferecido através da ingestão hídrica normal (água de torneira), de forma que a dose diária fosse de 10 mg/rato/dia (L-NAME), por um período de 04 semanas. Este tratamento teve início nas últimas 04 semanas do protocolo experimental e ocorreu concomitante ao treinamento físico no grupo treinado + L-NAME. Animais controle foram submetidos às mesmas condições experimentais, porém receberam apenas água de torneira. Foram controladas a ingestão líquida, os pesos corpóreos. E, no momento do procedimento cirúrgico, foi também avaliada a pressão arterial e a frequência cardíaca nos grupos estudados, utilizando-se do sistema PowerLab™.

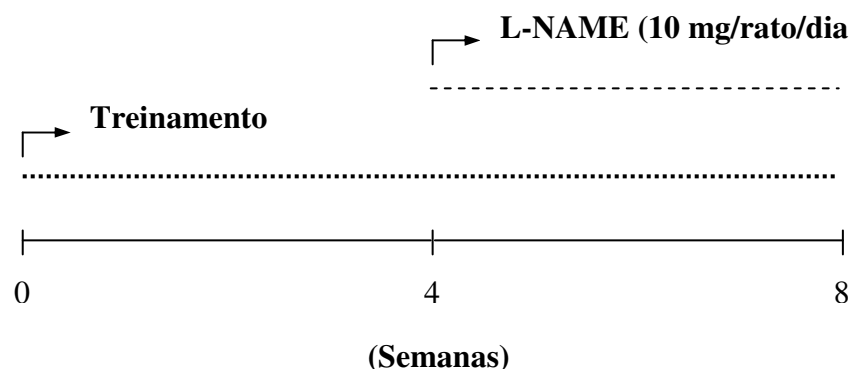
2.4. Grupos Experimentais

Os animais sedentários e treinados foram divididos nos seguintes grupos:

- I. *Grupo sedentário* (SD): ratos não treinados, dieta hídrica normal (água de torneira);
- II. *Grupo treinado* (TR): ratos treinados em esteira, dieta hídrica normal;
- III. *Grupo sedentário + tratamento com L-NAME* (SD+L-NAME): administrado na ingestão hídrica na dose aproximada de 10 mg/rato/dia;
- IV. *Grupo treinado + tratamento com L-NAME* (SD+L-NAME): administrado na ingestão hídrica na dose aproximada de 10 mg/rato/dia.

Em todos os grupos estudados, após estabilização dos parâmetros hemodinâmicos, administrou-se, por via endovenosa, o carbonato de lodenafil (1 mg/kg, bôlus), registrando-se em seguida pressão intracavernosa e pressão arterial.

Para avaliar a influência do exercício foi realizado o seguinte protocolo experimental. Os animais foram submetidos ao treinamento físico em esteira por um período total de 08 semanas, sendo que nas quatro primeiras semanas os animais foram apenas treinados (condicionamento físico). Ao fim da quarta semana, foi introduzido o L-NAME na ingestão hídrica que seguiu concomitante com o programa de treinamento físico até a oitava semana (veja esquema abaixo).



2.5 Monitoramento da Pressão Intracavernosa em Ratos Anestesiados

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg) por via intraperitoneal. A seguir foi realizada uma traqueostomia para facilitar a respiração do animal, a artéria carótida foi canulada para o 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 pressão foram registradas em sistema PowerLab™ de aquisição de dados (software versão 4.2, AD Instruments, MA, EUA).

Protocolo experimental

Após um período de estabilização de aproximadamente 3 a 4 minutos, estimulações elétricas no nervo cavernoso foram feitas para a construção de uma curva frequência-dependente (EFS, 2, 4, 6, 8 e 10 Hz). Em seguida, foi administrado carbonato de lodenafil (Helleva, 1 mg/kg/i.v.) pela veia jugular dos animais. Passados 5 minutos, uma

nova curva frequência-dependente foi realizada a fim de se registrar as alterações hemodinâmicas provocadas pela droga.

2.6. Análise Estatística

Para a avaliação das respostas eréteis *in vivo*, foram expressas a razão entre ICP (mmHg)/MAP (mmHg), onde ICP representa o pico de ereção em resposta a determinados estímulos e MAP a pressão arterial média no mesmo momento. Análise de variância (ANOVA) foi utilizando, seguido pelo teste de Bonferroni, utilizando o do programa estatístico GraphPad InStat versão 5. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) de n experimentos. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do Treinamento Físico

3.1.1. Peso Corporal

A tabela 1 mostra que, ao final do treinamento, os animais sedentários (SD) apresentaram um maior ganho ponderal ($P<005$) quando comparados com os ratos treinados (TR).

Tabela 1. Peso corporal dos animais controle sedentário (C-SD) e controle treinado (C-TR). Valores iniciais e após 08 semanas seguindo o protocolo experimental.

PESO CORPORAL (g)				
<i>Grupos</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	Δg	<i>n</i>
<i>C-SD</i>	228 $\pm$ 7	407 $\pm$ 11	179	05
<i>C-TR</i>	224 $\pm$ 10	356 $\pm$ 09	132*	05

Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média.

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

3.1.2. Pressão Arterial Média

O treinamento físico nos ratos treinados (C-TR) não alterou a pressão arterial quando comparados aos ratos sedentários (C-SD).

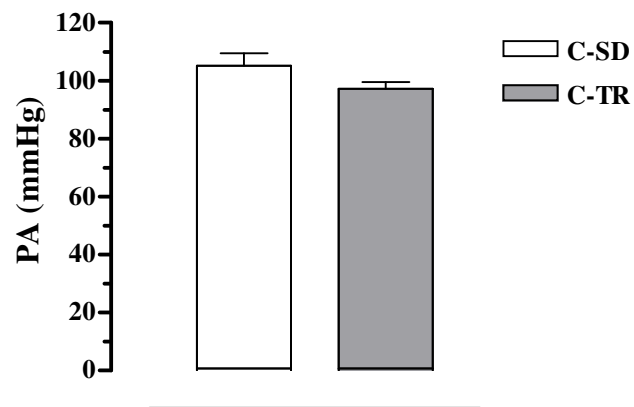


Figura 4. Pressão Arterial Média dos grupos sedentário (SD) e treinado (TR). Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de $n=5$ experimentos.

3.1.3. Medida da Pressão Intracavernosa

A pressão intracavernosa (ICP) e a pressão arterial (MAP) dos ratos anestesiados em condições basais permaneceram entre os valores médios de 18 ± 2 mmHg e 102 ± 5 mmHg, respectivamente ($n=10$). A estimulação elétrica do nervo cavernoso causou aumentos sustentados na ICP de maneira frequência-dependente (EFS: 2, 4, 6, 8 e 10 Hz), acompanhado de diminuições transitórias na MAP. A razão ICP sobre MAP foi utilizada para estabelecer um índice de atividade erétil.

A figura 5 mostra que, no grupo dos ratos sedentários (SD), a frequência mais alta utilizada (10 Hz) produziu um aumento de ICP de 48 mmHg. O treinamento (TR) não alterou significativamente a resposta induzida pela estimulação elétrica em nenhuma frequência (Figura 5). Além disso, o treinamento não alterou significativamente a razão ICP/MAP (Figura 6).

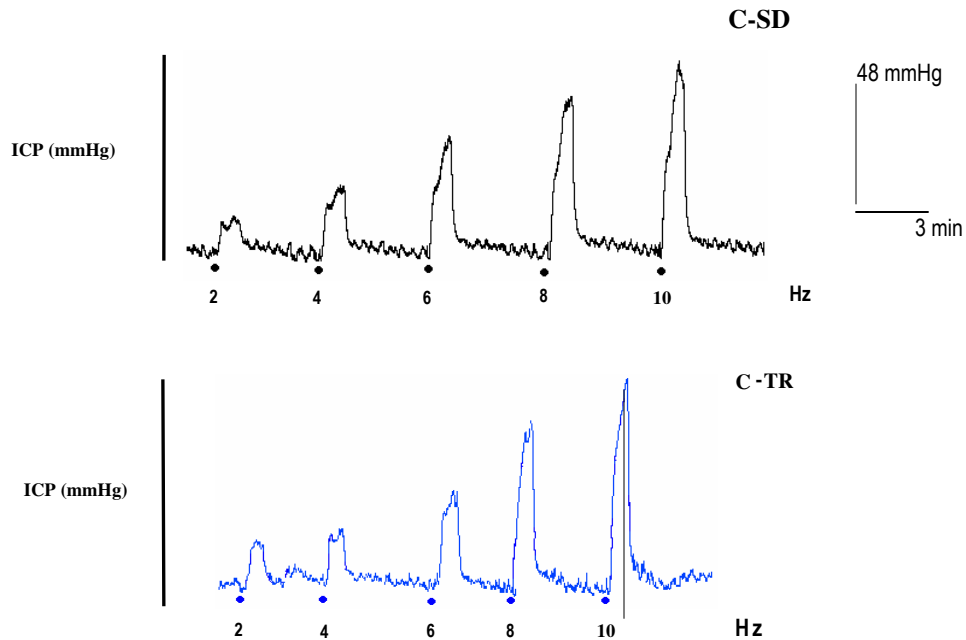


Figura 5. Representação gráfica da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico (EFS: 2, 4, 6, 8 e 10 Hz) de ratos sedentários (C-SD) e entre treinados (C-TR).

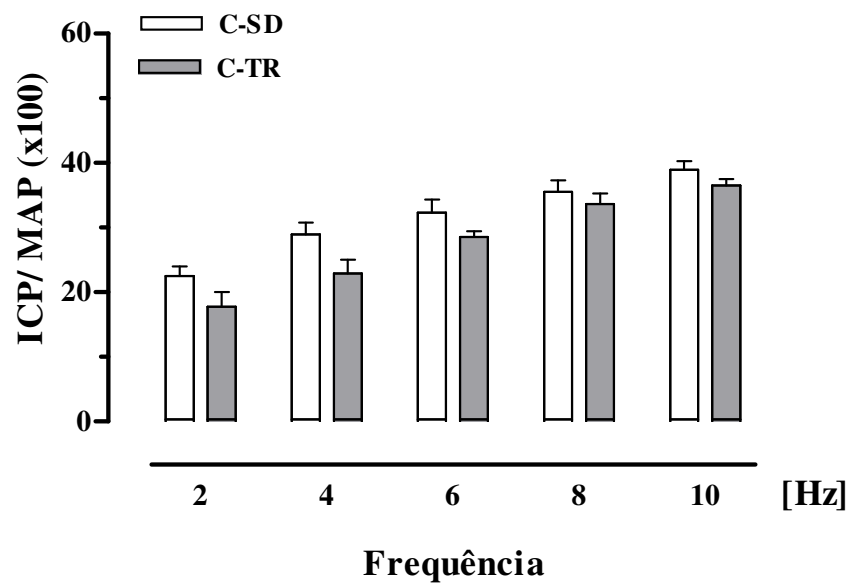


Figura 6. Efeito da pressão intracavernosa (ICP) induzida pelo estímulo elétrico (EFS: 2, 4, 6, 8 e 10 Hz) do nervo cavernoso de rato *in vivo* em animais sedentários (SD) e submetidos a treinamento (TR) durante 08 semanas. Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de 5 experimentos.

3.2 Efeito do Treinamento Físico na função erétil de ratos submetidos ao bloqueio crônico de óxido nítrico

3.2.1. Peso corporal

A tabela 2 mostra que, no grupo de ratos sedentários submetidos ao tratamento com uma dose aproximada de 10 mg/rato/dia de L-NAME (LN-SD), o peso corporal não foi alterado quando comparado ao grupo controle sedentário (C-SD). Similarmente, o tratamento com L-NAME no grupo treinado (LN-TR), não provocou alteração significativa no peso corporal quando comparado ao grupo controle treinado (C-TR).

Tabela 2. 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 08 semanas.

PESO CORPORAL (g)				
<i>Grupos</i>	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>Δ g</i>	<i>n</i>
<i>C-SD</i>	228 $\pm$ 7	407 $\pm$ 11	179	05
<i>C-TR</i>	224 $\pm$ 10	356 $\pm$ 09	132*	05
<i>LN-SD (10 mg)</i>	243 $\pm$ 3	415 $\pm$ 12	172	05
<i>LN-TR (10 mg)</i>	206 $\pm$ 7	345 $\pm$ 10	139 [#]	04

Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média para 4-5 ratos.

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

[#] $P < 0,05$ comparado com o grupo LN-SD.

3.2.2. Pressão Arterial de Animais Submetidos ao Tratamento com o L-NAME

A figura 7 mostra que a adição de L-NAME à dieta hídrica na dose de 10 mg/rato/dia, elevou em 25% e 18% a pressão arterial dos ratos LN-SD e LN-TR respectivamente. O treinamento físico atenuou significativamente a hipertensão arterial induzida pelo L-NAME (LN-TR). O treinamento físico (C-TR), individualmente, não modificou a pressão arterial dos ratos sedentários (C-SD).

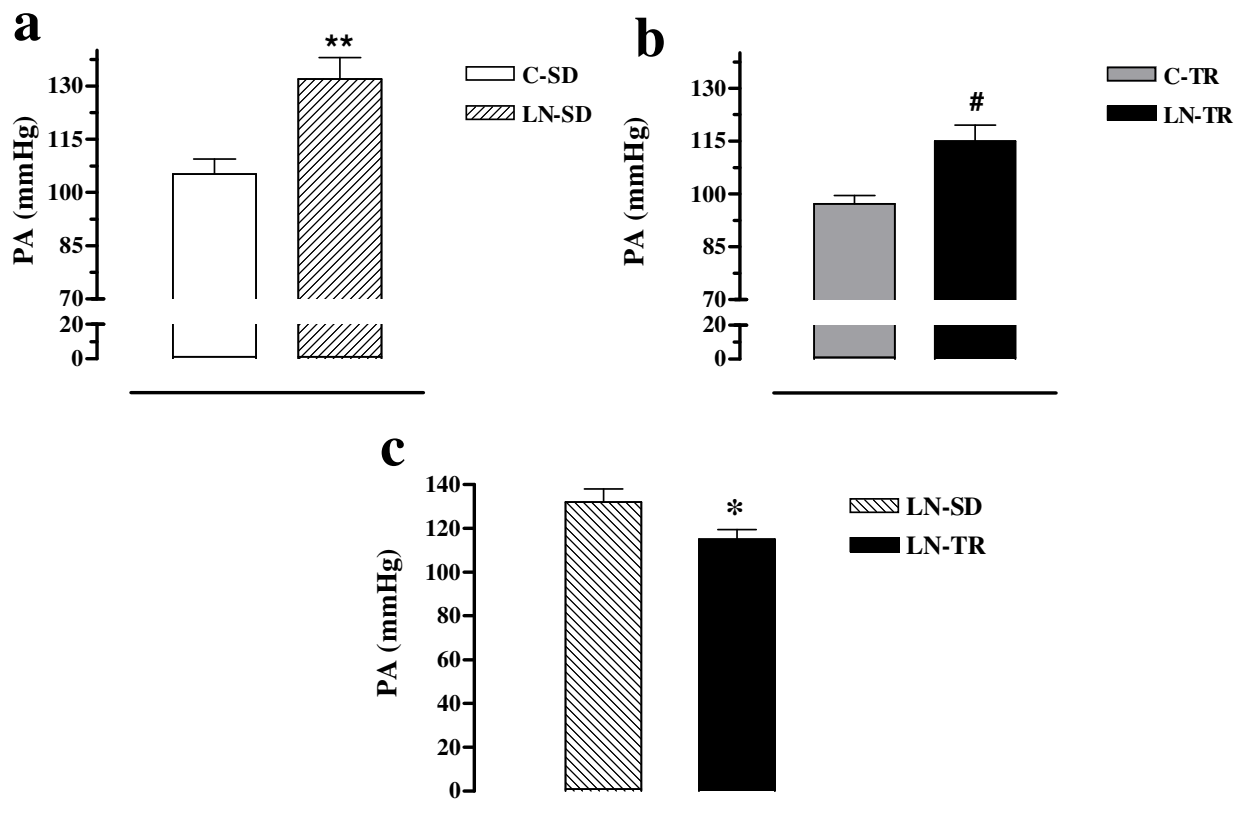


Figura 7. Pressão arterial dos grupos controle sedentário (C-SD), L-NAME sedentário (LN-SD, painel **a**), controle treinado (C-TR) e L-NAME treinado (LN-TR, painel **b**). O painel **c** mostra o efeito do treinamento no grupo dos ratos submetidos ao tratamento com L-NAME. Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de n=5 experimentos. **P<0,01 comparado ao grupo C-SD; #P<0,05 comparado ao grupo C-TR; *P<0,05 comparado ao grupo LN-SD.

3.2.3. Pressão Intracavernosa de Animais Submetidos ao Tratamento com L-NAME

O tratamento com L-NAME reduziu significativamente a razão ICP/MAP dos animais comparado ao grupo C-SD em todas as frequências utilizadas (Figura 8a). No grupo treinado, da mesma forma, notou-se a redução da razão ICP/MAP (Figura 8b).

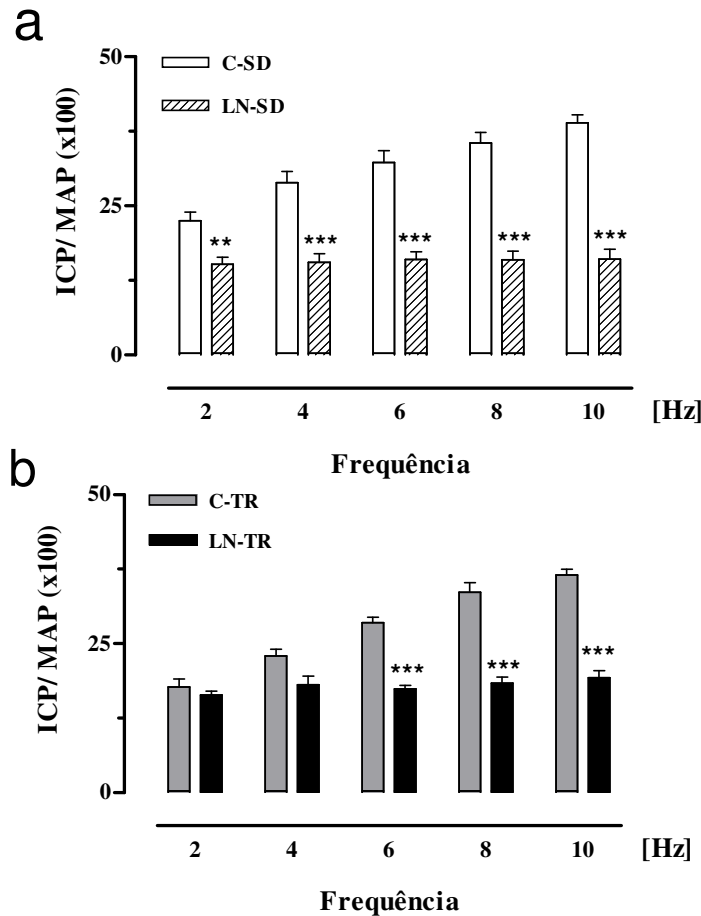


Figura 8. Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso de ratos grupos controle sedentário (C-SD), controle treinado (C-TR), L-NAME sedentário (LN-SD, painel **a**) e L-NAME treinado (LN-TR, painel **b**). Valores da razão pressão intracavernosa dividida pela pressão arterial média (ICP/MAP). Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de n=5 experimentos. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, comparado com seu respectivo grupo controle.

3.3. Efeito da Administração do Carbonato do Lodenafil (Helleva) no Aumento da Pressão Intracavernosa de Rato *in vivo*

3.3.1 Animais Sedentários

A estimulação elétrica (EFS: 2, 4, 6, 8 e 10 Hz) promoveu um aumento dependente de frequência da pressão intracavernosa de rato, quando analisados pelo aumento da razão ICP/MAP (Figura 9, painel a). A administração endovenosa de carbonato de lodenafil (1 mg/kg) aumentou significativamente a razão ICP/MAP em todas as frequências utilizadas (EFS: 2, 4, 6, 8 e 10 Hz). A figura 9, painel b, mostra o traçado de aumento da pressão intracavernosa *in vivo* após cada estimulação elétrica.

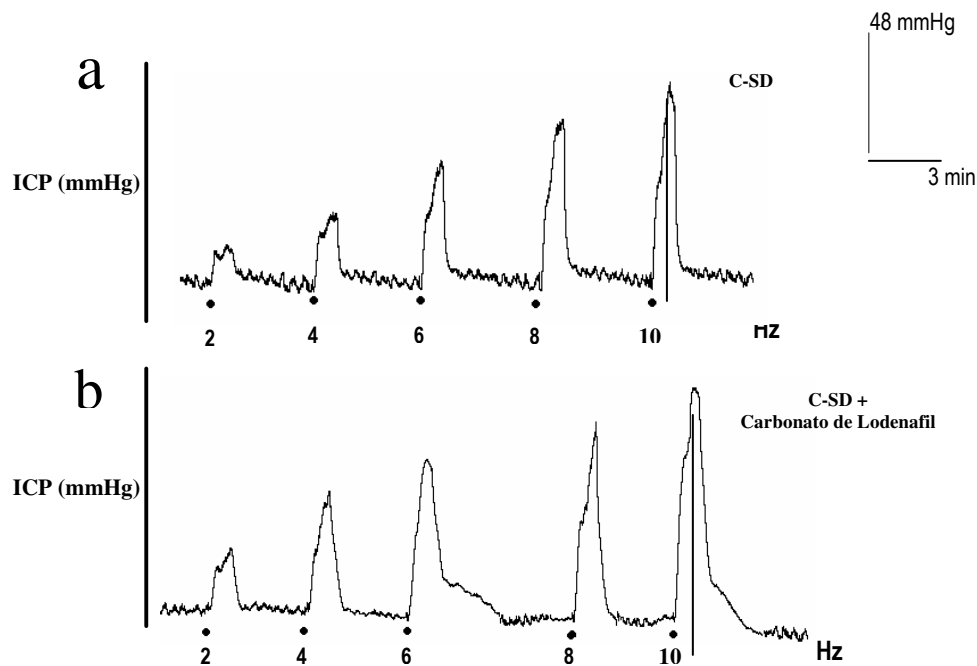


Figura 9. Representação gráfica da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico (2, 4, 6, 8, 10 Hz) de ratos sedentários (C-SD) na ausência (painel superior) e na presença do carbonato de lodenafil (painel inferior).

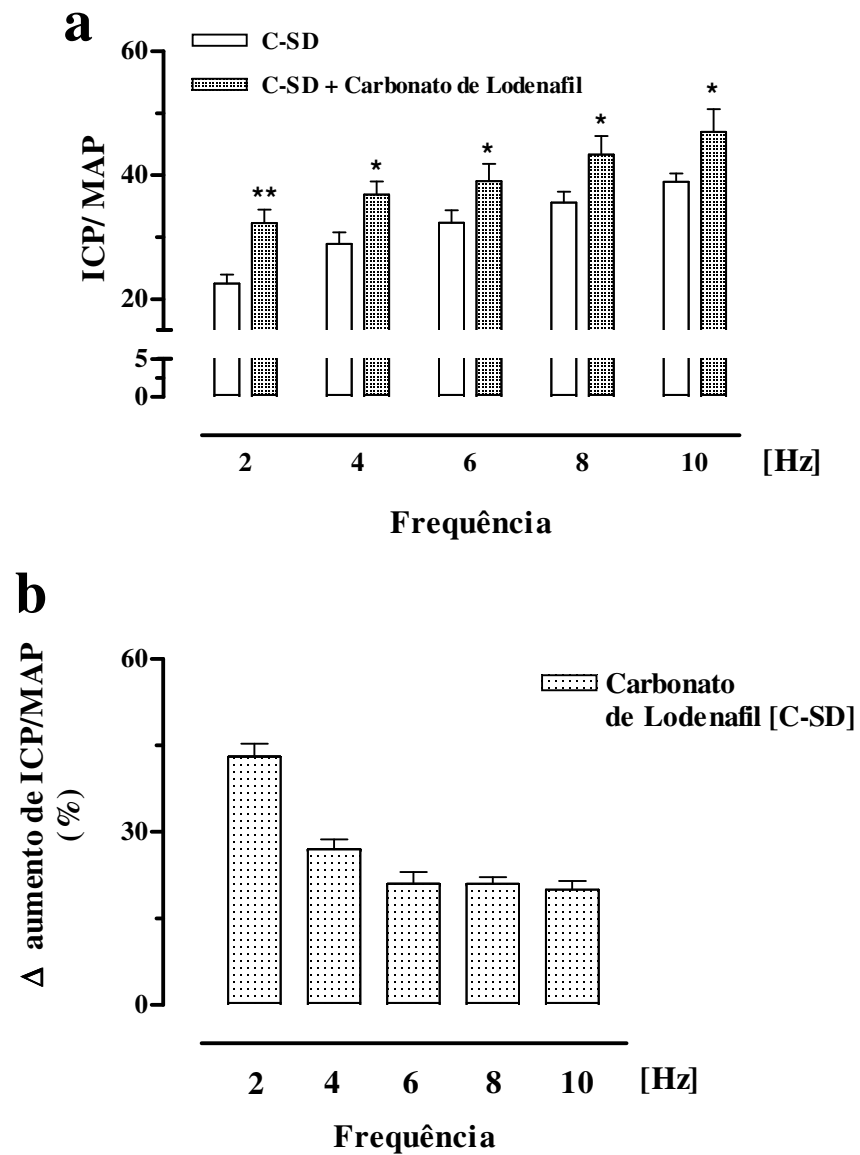


Figura 10. Efeito da administração endovenosa do carbonato de lodenafil (1 mg/kg; painel **a**) sobre a pressão intracavernosa em resposta à estimulação elétrica do nervo cavernoso de rato *in vivo*. Resultados foram calculados como a razão ICP/MAP. O painel **b** mostra a porcentagem de aumento da pressão intracavernosa. Dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de *n* experimentos. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, comparado aos valores controle.

3.3.2 Animais Treinados

A estimulação elétrica (EFS, 2, 4, 6, 8, 10 Hz) promoveu um aumento dependente da frequência da pressão intracavernosa de rato, quando analisados pelo aumento da razão ICP/MAP (Figura 11). A administração endovenosa de carbonato de lodenafil (1 mg/kg), em animais treinados, aumentou significativamente a razão ICP/MAP em todas as frequências utilizadas (EFS 2, 4, 6, 8, 10 Hz; Figura 11b). A figura 11 mostra o traçado de aumento da pressão intracavernosa *in vivo* após cada estimulação elétrica. Os valores de porcentagem de aumento do ICP/MAP estão mostrados na figura 12.

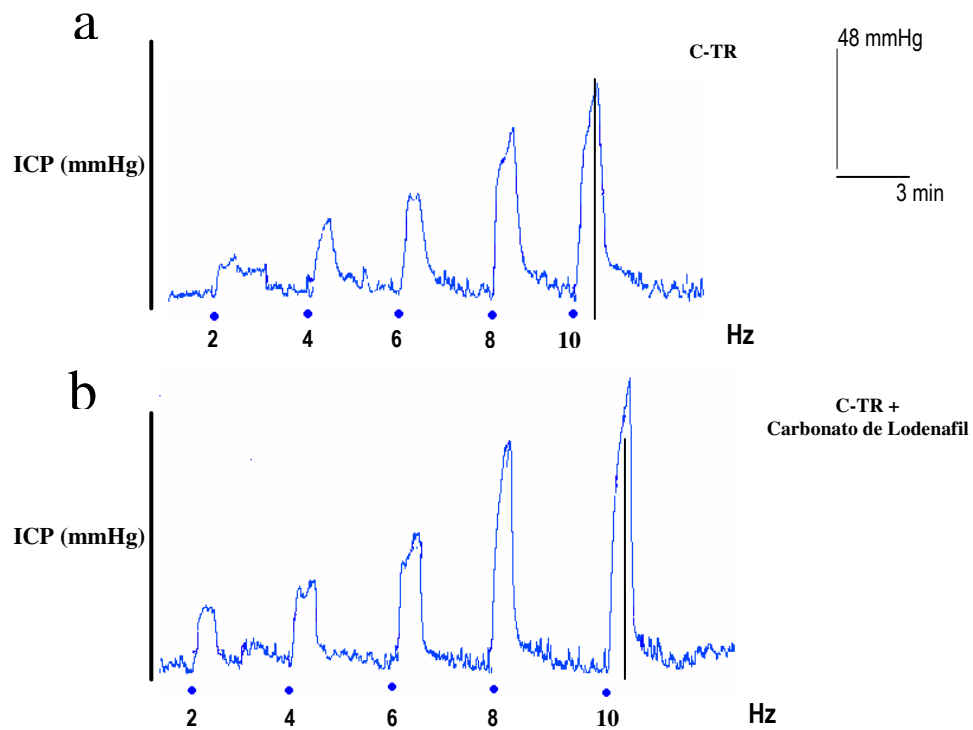


Figura 11. Representação gráfica da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico (EFS 2, 4, 6, 8, 10 Hz) de ratos treinados (C-TR) na ausência (painel superior) e na presença do carbonato de lodenafil (C-TR + Carbonato de Lodenafile; painel inferior).

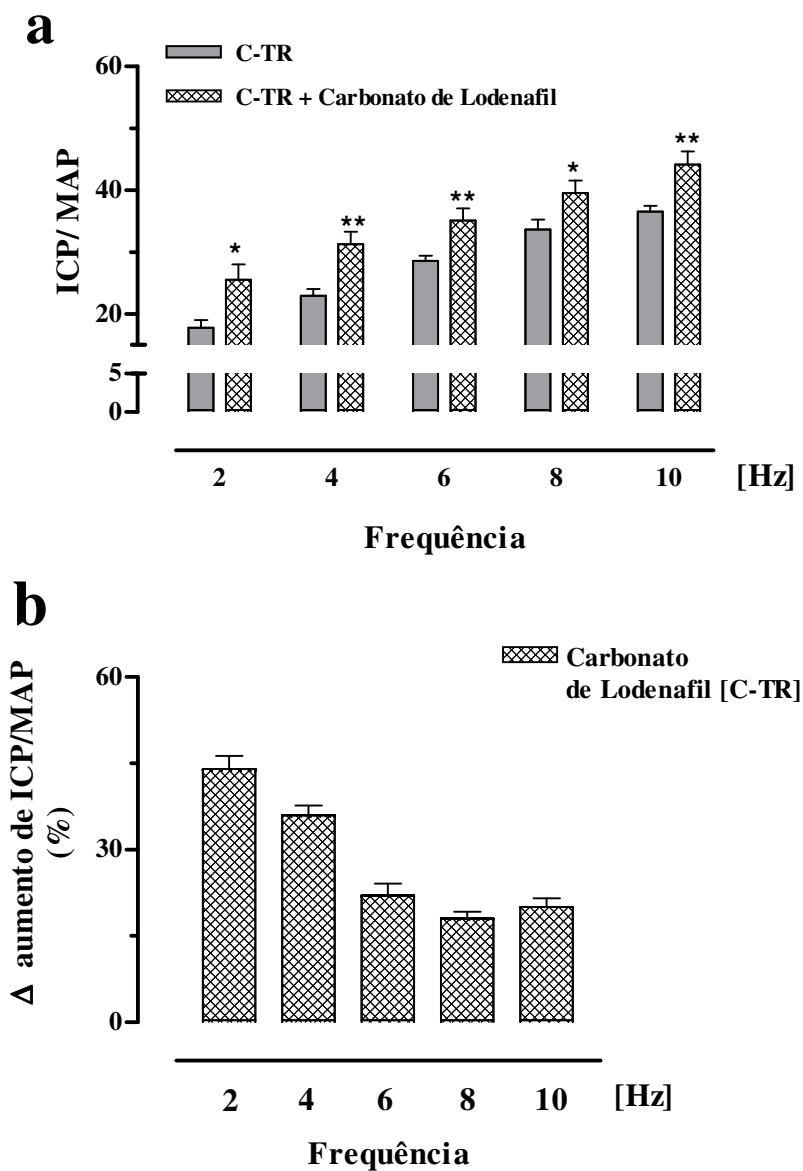


Figura 12. Efeito da administração endovenosa do carbonato de lodenafil (1 mg/kg, painel **a**) sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico do nervo cavernoso de rato *in vivo*. Resultados foram calculados como a razão ICP/MAP. O painel **b** mostra a porcentagem de aumento da pressão intracavernosa. Dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de n experimentos. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, comparado aos valores controle.

3.4. Efeito da Administração do Carbonato do Lodenafil (Helleva) em Ratos

Tratados com L-NAME

3.4.1. Animais Sedentários

Nossos resultados mostraram que o tratamento com L-NAME reduziu significativamente a razão ICP/MAP dos animais comparado ao grupo controle sedentário (C-SD) em todas as frequências (EFS: 2, 4, 6, 8 e 10 Hz). A administração endovenosa de carbonato de lodenafil (1 mg/kg), não conseguiu reverter essa diminuição da pressão intracavernosa induzida pelo tratamento com o L-NAME (Figura 13).

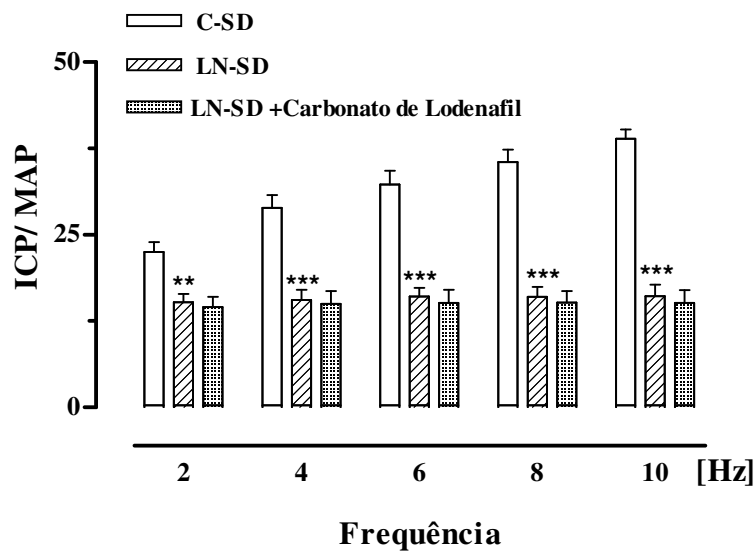


Figura 13. Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso de ratos grupos controle sedentário (C-SD) e L-NAME sedentário (LN-SD). Efeito da administração do carbonato de lodenafil (LN-SD + Helleva, 1 mg/kg) sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico do nervo cavernoso de rato *in vivo*. Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de n experimentos. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, comparado com seu respectivo grupo controle.

3.4.2. Animais Treinados

Nossos resultados mostraram que o tratamento com L-NAME reduziu significativamente a razão ICP/MAP dos animais comparado ao grupo controle sedentário (C-TR). A administração endovenosa de carbonato de lodenafil (1 mg/kg), não conseguiu reverter essa diminuição da pressão intracavernosa induzida pelo tratamento com o L-NAME (Figura 14).

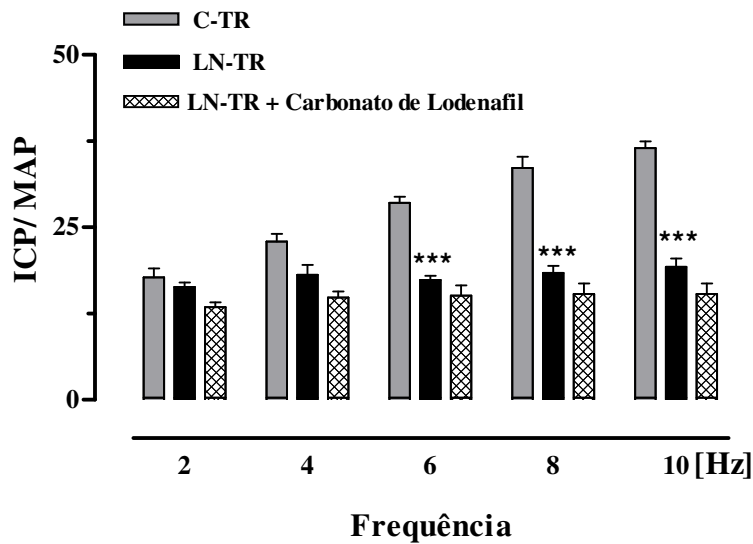


Figura 14. Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso de ratos grupos controle treinados (C-TR) e L-NAME treinados (LN-TR). Efeito da administração do carbonato de lodenafil (LN-TR + Helleva, 1 mg/kg) sobre o aumento da pressão intracavernosa induzida pelo estímulo elétrico do nervo cavernoso de rato *in vivo*. Os dados representam as médias $\pm$ erro padrão da média de n experimentos. *** $P < 0,001$, comparado com seu respectivo grupo controle.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos *in vivo* a função erétil de ratos normotensos ou hipertensos (após tratamento crônico com L-NAME), submetidos ou não ao treinamento físico por 8 semanas. Além disso, avaliamos um possível sinergismo entre o novo inibidor de PDE5, carbonato de lodenafil, e o treinamento físico na função erétil. Por último, investigamos se o inibidor de PDE5 (associado ou não ao treinamento físico) reverte os efeitos negativos na pressão intracavernosa, provocados pelo tratamento crônico com L-NAME.

Estudos prévios mostram que a prática regular de exercício físico aeróbico por 8 semanas melhora o relaxamento do corpo cavernoso de ratos normotensos ou tratados cronicamente com L-NAME (Claudino et al., 2004; 2007). No presente estudo, seguimos o mesmo protocolo de treinamento, e ao final das 8 semanas de estudo, a eficácia do programa de atividade física foi confirmada pelo menor ganho de peso corporal observado nos animais submetidos ao treinamento físico, tanto em animais normotensos como em animais hipertensos.

O treinamento físico não promoveu redução significativa dos valores de pressão arterial média (PAM) nos animais normotensos. Este dado corrobora com estudos prévios que mostram que a atividade física não altera a pressão arterial de ratos normotensos (Priviero et al., 2004; Claudino et al., 2007; Zanesco & Antunes 2007). No entanto, dados prévios do nosso laboratório mostram que em ratos tornados hipertensos pelo tratamento crônico com L-NAME, o exercício físico é capaz de prevenir significativamente o aumento da pressão arterial sistólica (Claudino et al., 2007). Similarmente, neste estudo,

observamos que o treinamento físico promoveu redução significativa da PAM em animais tratados cronicamente com L-NAME, confirmando a eficácia do programa de treinamento empregado.

A função erétil *in vivo* foi avaliada através da medida da pressão intracavernosa (ICP) de ratos, submetidos ou não ao exercício físico. Estudos *in vitro* reportaram uma melhora do relaxamento do corpo cavernoso de ratos normotensos e tratados cronicamente com L-NAME, após 8 semanas de atividade física aeróbia (Claudino et al., 2007). Neste estudo, observamos que o treinamento físico não ampliou a ICP dos ratos tratados com L-NAME, comparando com os ratos dos respectivos grupos controles. Este dado sugere que a disfunção erétil observada neste modelo de inibição da síntese de NO não está relacionada com a hipertensão e sim com o bloqueio da produção local de NO, ao nível do tecido erétil, uma vez que o exercício físico foi capaz de atenuar a hipertensão provocada pelo L-NAME, mas não foi capaz de atenuar a disfunção erétil. Estes dados vão ao encontro de outro estudo que mostrou que, em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o treinamento físico previne parcialmente a redução da ICP observada na hipertensão, comparado ao grupo SHR sedentário (Priviero et al., 2008). Neste modelo de hipertensão, ocorre uma redução da biodisponibilidade do NO, por aumento da produção das espécies reativas de oxigênio, que pode ser revertida pela produção de agentes antioxidantes durante a prática da atividade física. Em contrapartida, no modelo de hipertensão aplicado neste estudo, o L-NAME inibe a NOS, por se ligar de modo competitivo ao sítio de ligação do substrato desta enzima, a L-arginina, inibindo produção do NO. A L-arginina é sintetizada pelo organismo e participa de diversas funções críticas no organismo, como a regulação do pH, a despolarização da membrana

da célula endotelial, o metabolismo dos macronutrientes e no ciclo da uréia (Kolhmeier, 2003). É possível especular que a prática da atividade física leve a um aumento da síntese de L-arginina, aumentando o substrato para a NOS, e isto possa explicar os efeitos benéficos do exercício na redução da pressão arterial em animais tratados com L-NAME. Estes efeitos benéficos sobre a pressão arterial podem ser também atribuídos ao aumento da expressão da eNOS ou da heme oxigenase (Sun et al., 2008) uma vez que a HO é convertida a dióxido de carbono, que é um gás capaz de relaxar vasos sanguíneos de maneira similar ao NO (Wu & Wang, 2005; Ryter et al., 2006). Desta maneira, é possível que o exercício físico tenha promovido seus efeitos benéficos na via do NO, e estes efeitos poderiam ser responsáveis pela melhora da PAM observada neste estudo.

Em contrapartida, as diferenças na função erétil observadas *in vitro* e *in vivo* neste modelo de hipertensão induzida pela inibição da NOS podem estar relacionadas ao fato de que no estudo *in vitro*, as respostas decorrentes da estimulação elétrica são obtidas após o bloqueio seletivo das respostas adrenérgicas e colinérgicas, predominando as respostas elicitadas pelas fibras nitrérgicas. Por outro lado, durante a medida da ICP, pode ocorrer simultaneamente a estimulação adrenérgica, por meio da ativação dos plexos hipogástricos ou mesmo pela estimulação do plexo pélvico, uma vez que algumas fibras adrenérgicas se dirigem através dos nervos esplênicos para os plexos hipogástricos superior e mesentérico inferior de onde partem através do nervo hipogástrico em direção ao plexo pélvico (Dean & Lue, 2005). Deste modo, a melhora da resposta da via do NO poderia ter sido mascarada pelas respostas adrenérgicas. Além disso, é possível que o tratamento crônico com L-NAME tenha levado a uma regulação positiva da via adrenérgica, em decorrência da ausência ou redução do NO, para exercer suas ações

fisiológicas antagônicas ao sistema adrenérgico, tornando estas respostas mais pronunciadas.

O tratamento crônico com L-NAME aboliu a resposta erétil provocada pelo estímulo elétrico, tanto em animais sedentários como em animais treinados. Recentemente, foi desenvolvido um novo inibidor de PDE5, o carbonato de lodenafil (Toque et al., 2008a). Devido a importância dos inibidores de PDE5 no tratamento da disfunção erétil, neste estudo investigamos os efeitos da administração intravenosa do carbonato de lodenafil na pressão intracavernosa de ratos normotensos ou tratados com L-NAME, submetidos ou não ao treinamento físico. Em ratos normotensos sedentários ou treinados, observamos um aumento significativo da ICP em todas as frequências utilizadas (2, 4, 6, 8 e 10 Hz), tendo sido este ganho de ICP maior nas frequências de estimulação mais baixas. Além disto, o aumento produzido pelo carbonato de lodenafil na ICP foi similar entre os grupos, sedentário e treinado, sugerindo ausência de sinergismo entre o treinamento físico e o carbonato de lodenafil em produzir respostas eréteis em ratos saudáveis. Por outro lado, nos ratos tratados com L-NAME, a administração intravenosa do carbonato de lodenafil não foi capaz de produzir aumento da ICP, nem em ratos sedentários ou submetidos ao treinamento físico. Estes dados sugerem que o carbonato de lodenafil, diferentemente dos primeiros inibidores seletivos da PDE5 estudados, não amplia a resposta erétil quando a produção de NO está marcadamente inibida, uma vez que estudos prévios reportaram que o sildenafil, tadalafil e vardenafil *in vitro* são capazes de relaxar tecidos vasculares e não vasculares mesmo na presença do L-NAME (Teixeira et al, 2006; Toque et al., 2008b). A ausência de melhora da resposta erétil após administração intravenosa do carbonato de lodenafil em ratos treinados sugere

que a atividade física não promoveu alterações na disponibilidade do NO em valores suficientes para promover um sinergismo entre o carbonato de lodenafil e o NO liberado das terminações nitrérgicas durante a estimulação elétrica. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o exercício físico traz benefícios para a pressão arterial, mas não para a função erétil quando avaliada *in vivo*.

SUMÁRIO

5. SUMÁRIO

- ✓ O treinamento físico não alterou a pressão arterial média em animais normotensos;
- ✓ A pressão intracavernosa não foi alterada pelo treinamento físico em ratos normotensos;
- ✓ O tratamento com L-NAME aumentou significativamente a pressão arterial média nos animais sedentários e treinados, sendo este aumento atenuado significativamente pelo treinamento físico;
- ✓ O tratamento com L-NAME reduziu significativamente a pressão intracavernosa em animais sedentários e treinados;
- ✓ O inibidor de PDE5, Helleva, promoveu um aumento significativo da pressão intracavernosa tanto em ratos sedentários como em ratos treinados;
- ✓ O Helleva não reverteu significativamente os valores da pressão intracavernosa nos animais sedentários e treinados tratados com L-NAME.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Concluimos que o carbonato de lodenafil é eficaz em aumentar a pressão intracavernosa em ratos, e que a associação entre o carbonato de lodenafil e treinamento físico não restaurou a valores normais de ICP, os danos provocados pelo L-NAME.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOSEIF SR, LUE TH (1988). Hemodynamics of penile erection. *Urol. Clin. North. Am.*, **15**: 1-7.
- ACSM (American College Sports Medicine, 2000). Manual do ACSM para teste de esforço e prescrição de exercício. Tradução: Paula Chermont P. Estima. 5.ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.66.
- ANDERSSON KE, WAGNER G (1995). Physiology of penile erection. *Physiol. Ver.*, **75**: 191-236.
- AYAJIKI K, HAYASHIDA H, OKAMURA T, TODA N (1999). Influence of denervation on neurogenic inhibitory response of corpus cavernosum and nitric oxide synthase histochemistry. *Brain Res.*, **825** : 14-21
- AZADZOI KM, VLACHIOTIS J, PONTARI M, SIROKY MB (1995). Hemodynamics of penile erection: III. Measurement of deep intracavernosal and subtunical blood flow and oxygen tension. *J. Urol.*, **153**: 521-526.
- BALLARD SA, GINGELL CJ, TANG K, TURNER LA, PRICE ME, NAYLOR AM (1998). Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J. Urol.*, **159**: 2164-2171.
- BANZ WJ, MAHER MA, THOMPSON WG, BASSETT DR, MOORE W, ASHRAF M, KEEFER DJ, ZEMEL MB (2003). Effect of resistance versus aerobic training on coronary artery disease risk factors. *Exp. Biol. Med.*, **288**: 434-440.
- BEAVO JA (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.*, **75** (4): 725-748.
- BITSCH M, KROMANN-ANDERSEN B, SCHOU J, SJONTOFT E (1990). The elasticity and the tensile strength of tunica albuginea of the corpora cavernosa. *J. Urol.*, **143**: 642-645.

- 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** : H468-472.
- BURNETT AL, LOWENSTEIN CJ, BREDT DS, CHANG TSK, SNYDER SH (1992). Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science.*, **257**: 401-403.
- BURNETT AL, TILLMAN SL, CHANG TSK, EPSTEIN JI, LOWENSTEIN CJ, BREDT DS, SNYDER SH, WALSH PC (1993). Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in the autonomic innervation of the human penis. *J. Urol.*, **150**: 73-76.
- BURNETT AL (2006). Erectile dysfunction. *J. Urol.*, **175** : S25-31.
- BUSH PA, GONZALEZ NE, IGNARRO LJ (1992). Biosynthesis of nitric oxide and citrulline from L-arginine by constitutive nitric oxide synthase present in rabbit corpus cavernosum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186** : 308-314.
- CASTELLI W P (1984). Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am. J. Med.*, **76**: 4-12.
- CHRIST GJ, KIM DC, TAUB HC, GONDRE CM, MELMAN A (1995). Characterization of nitroglycerine-induced relaxation in human corpus cavernosum smooth muscle: implications to erectile physiology and dysfunction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**: 1714-1726.
- 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**: 1004-1008.
- 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**:189-195.

- COOPER D, STOKES KY, TAILOR A, GRANGER DN. (2002) Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc. Toxicol.*, **2**:165-80.
- CORBIN JD, BEASLEY A, BLOUNT MA, FRANCIS SH (2004). Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). *Neurochem. Int.* **45**: 859-863.
- COTE RH (2004). Characteristics of photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5. *Int. J. Impot. Res.*, **16** (Suppl. 1): S28-S33.
- COUILLARD C, DESPRES JP, LAMARCHE B, BERGERON J, GAGNON J, LEON AS, RAO DC, SKINNER JS, WILMORE JH, BOUCHARD C (2001). Effect of endurance exercise training on plasma HDL cholesterol levels depend on levels of triglycerides: evidence from men of the health, risk factors, exercise training and genetics (Heritage) family studies. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**: 1226-1232.
- DEAN RC, LUE TF (2005). Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol. Clin. North. Am.*, **32**: 379-395.
- EVGENOV OV, PACHER P, SCHMIDT PM, HASKÓ G, SCHMIDT HH, STASCH JP (2006). NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**:755-768.
- FLORES TOQUE HA, PRIVIERO FB, TEIXEIRA CE, PERISSUTTI E, FIORINO F, SEVERINO B, FRECENTESE F, LORENZETTI R, BARACAT JS, SANTAGADA V, CALIENDO G, ANTUNES E, DE NUCCI G (2008). Synthesis and pharmacological evaluations of sildenafil analogues for treatment of erectile dysfunction. *JMC* **51**: 2807-2815.
- FORESTA C, CARETTA N, ZUCCARELLO D, POLETTI A, BIAGIOLI A, CARETTI L, GALAN A (2008). Expression of the PDE5 enzyme on human retinal tissue: new aspects of PDE5 inhibitors ocular side effects. *Eye*, **22**: 144-149.

- FRANKLIN BA, GORDON S, TIMMIS GC (1991). Exercise prescription for hypertensive patients. *Ann. Med.*, **23**: 279-287.
- GARCIA-CARDENA G, FAN R, SHAH V, SORRENTINO R, CIRINO G, PAPAPETROPOLO A, SESSA WC (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **392**, 821-824.
- GOLDSTEIN I, LUE TF, PADMA-NATHAN H, ROSEN RC, STEERS WD, WICKER PA (1998). Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil study group. *N. Engl. J. Méd.*, **338**: 1397-1404.
- HAYASHIDA H, FUJIMOTO H, YOSHIDA K, TOMOYOSHI T, OKAMURA T, TODA N (1996). Comparison of neurogenic contraction and relaxation in canine corpus cavernosum and penile artery and vein. *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**: 231-240.
- 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**: 349-360.
- HELLSTROM WJG, MONGA M, WANG R, DOMER FR, KADOWITZ PJ, ROBERTS JA (1994). Penile erection in the primate: induction with nitric oxide donors. *J Urol.*, **151**: 1723-1727.
- HIGASHI Y, YOSHIKUNI M (2004). Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol. Ther.* **102**: 87-96.
- HOLMQUIST F, STIEF CG, JONAS U, ANDERSSON KE (1991). Effects of the nitric oxide synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine on the erectile response to cavernous nerve stimulation in the rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, **143**: 299-304.
- HOLMQUIST F, HEDLUND H, ANDERSSON KE (1992). Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. *Acta Physiol. Scand.*, **449**: 295-311.
- HOLMQUIST F, FRIDSTRAND M, HEDLUND H, ANDERSSON KE (1993). Actions of 3-morpholininosydnonimin (SIN-1) on rabbit isolated penile erectile tissue. *J. Urol.*, **150**: 1310-1315.

- 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**: 3336-3343.
- 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.
- JI HH, SHIM HJ, YOO M, PARK E-S, LEE HS (2007). Transport of a new erectogenic udenafil in Caco-2 cells. *Arch. Pharm. Res.*, **9**: 1168-1173.
- JIN L, LAGODA G, LEITE R, WEBB RC, BURNETT AL (2008). NADPH oxidase activation: a mechanism of hypertension-associated erectile dysfunction. *J. Sex. Med.*, **5**: 544-551.
- 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.
- 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 (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 mechanism of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc. Res.*, **1**: 187-197.

- KOHLMEIER M (2003). *Nutrient Metabolism*. NY: Academic Press.
- KRANE RJ, GOLDSTEIN I, SAENZ DE TEJADA I(1989). Impotence. *N. Engl. J. Med.*, **321**: 1648-1659.
- 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**: 733-736.
- LUE TH, TANAGHO EA (1987). Physiology of erection and pharmacological management of impotence. *J. Urol.*, **137**: 829-836.
- LUE TH, TANAGHO EA (1988). Functional anatomy and mechanism of penile erection. In: *Contemporary management of impotence and infertility*, edited by E. A. Tanagho, T. H. Lue and R. D. McClure. Baltimore, *Williams & Wilkins*, 39-50.
- MAURICE DH, PALMER D, TILLEY DG, DUNKERLEY HÁ, NETHERTON SJ, RAYMOND DR, ELBATARNY HS, JIMMO SL (2003). Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity expression and targeting in cells of the cardiovascular system. *Mol. Pharmacol.*, **64**: 533-546.
- 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**: 1333-1341.
- MULLER JM, CHILIAN WM, DAVIS MJ (1997). Integrin signaling transduces shear stress-dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circ. Res.*, **80**: 320-326.
- 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**: H1075-1081.
- PAFFENBARGER RS, HYDE RT, WING 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.

- PICKARD RS, POWELL PH, ZAR MA (1991). The effects of inhibition of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **104**: 755-759.
- 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. Resumo.
- PRIVIERO FB, DE NUCCI G, ANTUNES E, ZANESCO A (2004). Negative chronotropic response to adenosine receptor stimulation in rat right Atria after run training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**: 741-743.
- PRIVIERO FB, NUNES KP, ZEMSE SM, WEBB RC (2008). Physical activity improves erectile function in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Rev. Soc. Bras. Hipertens.*, **11**: 63, Resumo.
- RAJFER J, ARONSON WJ, BUSH PA, DOREY FJ, IGNARRO LJ (1992). Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.*, **326**: 90-94.
- RECIO P, LOPEZ PG, HERNANDEZ M, PRIETO D, CONTRERAS J, GARCIA-SACRISTAN A (1998). Nitrgic relaxation of the horse corpus cavernosum. Role of cGMP. *Eur. J. Pharmacol.*, **351**: 85-94.
- 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
- RYTER SW, ALAM J, CHOI AMK. (2006) Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.*, **86**: 583–650.

- RYBALKIN SD, YAN C, BORNFELDT KE, BEAVO JA (2003). Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ. Res.*, **93**: 280-291.
- SAENZ DE TEJADA I, GOLSTEIN I, BLANCO R, COHEN RA, KRANE RJ (1985). Smooth muscle of the corpora cavernosae: role in penile erection. *Surg. Forum.*, **36**: 623-624.
- SAENZ DE TEJADA I, MOROUKIAN P, TESSIER J, KIM JJ, GOLDSTEIN I, FROHRIB D (1991). Trabecular smooth muscle modulates the capacitor function of the penis. Studies on a rabbit model. *Am. J. Physiol.*, **260**: H1590-H1595.
- SATTAR AA, WESPES E, SCHULMAN CC (1994). Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. *Eur. Urol.*, **25**: 142-144.
- 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**: 184-190.
- SHIRAI M, ISHII N, MITSUKAWA S, MATSUDA S, NAKAMURA M (1978). Hemodynamic mechanism of erection in the human penis. *Arch. Androl.*, **1**: 345-349.
- SHUKLA N, JONES R, PERSAD R, ANGELINI GD, JEREMY JY (2005). Effect of sildenafil citrate and a nitric oxide donating sildenafil derivative, NCX 911, on cavernosal relaxation and superoxide formation in hypercholesterolaemic rabbits. *Eur. J. Pharmacol.*, **11**: 517: 224-231.
- SODERLING SH, BEAVO JA (2000). Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 174-179.
- SUN MW, ZHONG MF, GU J, QIAN FL, GU JZ, CHEN H (2008). Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens. Res.*, **31**: 805-816.

- TAKIMOTO E, KASS DA. (2007) Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.*, **49**: 241-248.
- TEXEIRA MM, GRISTWOOD RW, COOPER N (1997). Phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitors: anti-inflammatory drugs of the future? *TIPS*, **18**: 164-170.
- TEIXEIRA CE, PRIVIERO FB, WEBB RC (2006). Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.*, **316**: 654-661.
- THORPHY TJ (1998). Phosphodiesterase isozymes.Molecular targets for novel antiasthma agents. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, **157**: 351-370.
- TOQUE HA, TEIXEIRA CE, LORENZETTI R, OKUYAMA CE, ANTUNES E, DE NUCCI (2008).. Pharmacological characterization of a novel phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor lodenafil carbonate on human and rabbit corpus cavernosum. *Eur. J. Pharm.* **591**: 189-195.
- TOQUE HA, PRIVIERO FB, ZEMSE SM, ANTUNES E, TEIXEIRA CE, WEBB RC. (2008a) Effect of the phosphodiesterase 5 inhibitors sildenafil, tadalafil and vardenafil on rat anococcygeus muscle: functional and biochemical aspects. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, *in press*.
- TOQUE HA, TEIXEIRA CE, PRIVIERO FB, MORGANTI RP, ANTUNES E, DE NUCCI G. (2008b) Vardenafil, but not sildenafil or tadalafil, has calcium-channel blocking activity in rabbit isolated pulmonary artery and human washed platelets. *Br. J. Pharmacol.*, **154**: 787-796.
- TRAISH AM, KIM NN, GOLDSTEIN I, MORELAND RB (1999). Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. *J. Androl.*, **20**: 671-682
- TRAISH AM, GUAY A, FEELEY R, SAAD F (2008). The Dark Side of Testosterone Deficiency: I. Metabolic Syndrome & Erectile Dysfunction *Journal of Andrology (in press)*

TSENG H, PETERSON TE, BERK BC (1995). Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ. Res*, **77**: 869-878.

ZANESCO A, ANTUNES E (2007). Effects of exercise training on the cardiovascular system: *Pharmacol*, **114**: 307-317.

WANG R, DOMER FR, SIKKA SC, KADOWITZ PJ, HELLSTROM WJ (1994). Nitric oxide mediates penile erection in cats. *J. Urol.*, **151**(1): 234-237.

WU L, WANG R (2005) Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol. Rev.*, **57**: 585–630.