

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

ANDRESSA KELLY PINHEIRO DE JESUS

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM NOVO COMPOSTO
DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO DERIVADO DO
RESVERATROL, (E)-4-(4-(4-metoxiestiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-
oxadiazol 2-óxido (RVT-FxME) PARA O TRATAMENTO DO
PRIAPISMO NA ANEMIA FALCIFORME**

Bragança Paulista

2022

ANDRESSA KELY PINHEIRO DE JESUS – R.A. 001202010033

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UM NOVO COMPOSTO
DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO DERIVADO DO
RESVERATROL, (E)-4-(4-(4-metoxiestiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-
oxadiazol 2-óxido (RVT-FxME) PARA O TRATAMENTO DO
PRIAPISMO NA ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva

Bragança Paulista

2022

WJ 709
J56a

Jesus, Andressa Kely Pinheiro de

Avaliação farmacológica de um novo composto doador de óxido nítrico derivado do resveratrol, (e)-4-(4-(4-metoxiestiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (rvt- fxme) para o tratamento do priapismo na anemia falciforme / Andressa Kely Pinheiro de Jesus. -- Bragança Paulista, 2022.

71 p.

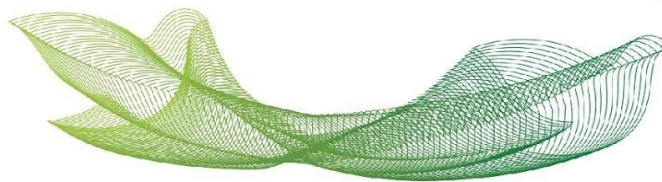
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Fábio Henrique da Silva.

1. Estresse Oxidativo. 2. Priapismo. 3. Disfunção Erétil.
4. Hemólise. I. Silva, Fábio Henrique da. II. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF

Ficha catalográfica elaborada por: Bruna Maria Campos da Cunha / CRB-8/10204



JESUS, Andressa Kely Pinheiro De. “Avaliação farmacológica de um novo composto doador de óxido nítrico derivado do resveratrol, (E)-4-(4-(4-metoxiestiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (RVT-FxME) para o tratamento do priapismo na anemia falciforme”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 15 de fevereiro de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco

Prof. Dr. Eduardo Costa Alexandre
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Fabiano Beraldi Calmasini
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por permitir e me dar forças diariamente para conseguir enfrentar todas as dificuldades até aqui e encher constantemente meu coração de esperança e alegria.

Aos meus pais, Andreia e Claudimiro, que sempre incentivaram meus estudos e me guiaram até aqui. Amo vocês e serei eternamente grata.

A minha querida irmã e amiga, Gleice, minha motivação para continuar na busca do melhor da vida. Obrigada por ser uma das melhores pessoas na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio da Silva, sou imensamente grata por sua orientação, paciência e ensinamentos.

Aos meus pais, Andreia e Claudimiro, que praticamente deram suas vidas para que eu e meus irmãos conquistássemos o melhor nos estudos e profissionalmente. Tudo é por vocês.

Aos meus irmãos Alisson e Gleice, motivação para me dedicar aos meus estudos e profissão. Amarei eternamente vocês e buscarei sempre os deixar orgulhosos.

A Chloe, minha cachorra, a qual amo mais que a mim mesma, meu refugio e amor puro.

Agradeço a minha amiga Leticia, que mesmo distante só me forneceu afeto e paciência mesmo nas minhas ausências.

A minha amiga Mirele, que sem ela, sem seu apoio, amor e confiança, nunca teria chego nem mesmo ao fim da graduação.

Ao meu cantor favorito, Emicida, que me incentivou a brilhar como o sol, mesmo em dias difíceis, seu disco AmarElo, por muitas vezes salvou minha vida e me incentivou a prosseguir.

Ao meu cunhado João, que muitas vezes se preocupou e me incentivou. Amo você.

A professora Glaucia, sempre presente, ensinando, sendo exemplo, com muito amor e paciência.

A minha psicóloga Joice, agradeço pelo profissionalismo e carinho, sem o seu auxilio nada disso seria possível.

As minhas tias Sandra e Adriana, lembradas sempre por seu amor e cuidado.

Aos meus primos Jadson, Elen, Glebson, Mariana, Joel, Maiana e Franciele, a distância não diminui nosso carinho.

A Universidade São Francisco, a qual me forneceu a bolsa BDC e através dela recebi a oportunidade do mestrado, sou imensamente grata.

RESUMO

Estudos epidemiológicos mostraram que 30 a 45% dos homens com doença falciforme têm episódios de priapismo e 30% dele progridem para a disfunção erétil. Embora o priapismo seja comum, os tratamentos disponíveis atuam de forma aguda e não preventiva. A biodisponibilidade reduzida do óxido nítrico endotelial parece ser a chave para o desenvolvimento do priapismo na anemia falciforme, pois a baixa biodisponibilidade do NO reduz a atividade e a expressão da fosfodiesterase do tipo 5, alterando assim o mecanismo de ereção peniana. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o tratamento crônico com o novo composto doador de NO o RVT-FxMe, destinado a restaurar alterações na disfunção erétil em camundongos transgênicos para anemia falciforme e *knockouts* para a enzima eNOS (eNOS^{-/-}). Camundongos controles (C57Bl/6), transgênico para anemia falciforme (SCD) e eNOS^{-/-} foram tratados com o veículo ou com o composto RVT-Fx-Me (25 mg/Kg/dia) por 2 semanas. Os valores de hemácia e hemoglobina total foram consideravelmente menores em camundongos transgênicos para anemia falciforme tratados com o veículo ou composto RVT-Fx-Me em comparação com os camundongos controles e eNOS^{-/-} tratados com o veículo ou o composto. Os valores de hemoglobina plasmática foram significativamente maiores no grupo SCD-veículo e SCD-RVT-Fx-Me em comparação com os dos grupos controles e eNOS^{-/-} tratados com o veículo ou RVT-Fx-Me. O relaxamento induzido pelo SNP e estimulação elétrica foi significativamente maior nos corpos cavernosos do grupo eNOS^{-/-}-veículo em comparação com o grupo controle. O tratamento com RVT-Fx-Me normalizou o relaxamento induzido pelo SNP e estimulação elétrica nos camundongos eNOS^{-/-}, mas não modificou no grupo controle. No grupo SCD-veículo, o relaxamento induzido pela ACh, SNP e estimulação elétrica (EFS) foi significativamente maior em comparação com o grupo controle. O tratamento com RVT-Fx-Me não modificou o relaxamento nos corpos cavernosos do grupo SCD. Em resumo, nossos resultados demonstraram que o tratamento com o composto RVT-FxMe reverte as alterações funcionais da via NO-GMPc nos corpos cavernosos de camundongos eNOS^{-/-}, mas não nos camundongos SCD.

Palavras-chave: GMP Cíclico. Corpo cavernoso. Estresse oxidativo. Disfunção erétil. Hemólise.

ABSTRACT

Epidemiological studies have shown that 30 to 45% of men with sickle cell disease have episodes of priapism and 30% of them progress to erectile dysfunction. Although priapism is common, available treatments are acute rather than preventive. The reduced bioavailability of endothelial nitric oxide appears to be the key to the development of priapism in sickle cell anemia, as the low bioavailability of NO reduces the activity and expression of type 5 phosphodiesterase, thus altering the penile erection mechanism. Therefore, the objective of this work was to evaluate chronic treatment with the new NO donor compound RVT-FxMe, aimed at restoring alterations in erectile dysfunction in transgenic mice for sickle cell anemia and knockouts for the eNOS enzyme (eNOS^{-/-}). Control mice (C57Bl/6), transgenic for sickle cell anemia (SCD) and eNOS^{-/-} were treated with the vehicle or the compound RVT-Fx-Me (25 mg/kg/day) for 2 weeks. Red blood cell and total hemoglobin values were lower in sickle cell transgenic mice treated with the vehicle or RVT-Fx-Me compound compared to control and eNOS^{-/-} mice treated with the vehicle or compound. Plasma hemoglobin values were significantly higher in the SCD-vehicle and SCD-RVT-Fx-Me group compared to the control and eNOS^{-/-} groups treated with the vehicle or RVT-Fx-Me. SNP-induced relaxation and electrical stimulation-induced relaxation was significantly greater in corpus cavernosum of the eNOS^{-/-}-vehicle group compared to the control group. Treatment with RVT-Fx-Me normalized SNP-induced relaxation and electrical stimulation-induced relaxation in eNOS^{-/-} mice, but did not change in the control group. In the SCD-vehicle group, relaxation induced by ACh, SNP and electrical stimulation (EFS) was significantly higher compared to the control group. Treatment with RVT-Fx-Me did not modify relaxation in the corpora cavernosa of the SCD group. In summary, our results demonstrate that treatment with the compound RVT-FxMe reverses the functional alterations of the NO-GMPc pathway in the corpora cavernosa of eNOS^{-/-} mice, but not in SCD mice

Keywords: *Cyclic GMP. Cavernous body. Oxidative stress. Erectile Dysfunction. Hemolysis.*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

α -AR	α -adrenoceptores
ACh	Acetilcolina
CC	Corpos cavernosos
DAG	Diacilglicerol
EFS	Estimulação Elétrica
E _{max}	Resposta Máxima
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
E.P.M	Erro Padrão Das Médias
ETs	Endotelinas
GCs	Guanilil Ciclase Solúvel
GMP _c	Monofosfato Cíclico De Guanosina
GTP	Guanosina Trifosfato
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
IP3	Inositol Trisfosfato
MLC20	Cinase da cadeia leve de miosina
NO	Óxido Nítrico
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOS	Óxido Nítrico Síntase
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
PDE5	Fosfodiesterase Tipo 5
pEC50	Potência
PI3K	Fosfatidil-Inositol 3-Kinase

PKG	Proteína Quinase Ativada por GMPc
RVT-FxMe	(E)-4-(4-(4-metoxiestiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido
SNP	Nitroprussiato De Sódio

LISTA DE FIGURAS

1. **FIGURA 1:** Sinalização NO/GCs/GMPc: Principal via de relaxamento do músculo liso cavernoso..... 16
2. **FIGURA 2:** Polimerização da Hemoglobina S 17
3. **FIGURA 3:** Estrutura química do resveratrol and RVT-FxMe. 21
4. **FIGURA 4:** Parâmetros hematológicos em camundongos controle, eNOS^{-/-} e falciformes (SCD) tratados com o veículo ou com composto RVT-Fx-Me. (A) Eritrócitos, (B) hemoglobina total e (C) hemoglobina plasmática. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 8 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle-Veículo. 29
5. **FIGURA 5:** Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas (1 – 32 Hz) em corpos cavernosos de camundongos controles e eNOS^{-/-} tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle; #P < 0.05 comparado com o grupo eNOS^{-/-}-Veículo. 30
6. **FIGURA 6:** (A-C) Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos de camundongos controles e eNOS^{-/-} tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. (D) Valores de resposta máxima (Emax) e (E) potência (pEC50) do SNP. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle; #P < 0.05 comparado com o grupo eNOS^{-/-}..... 31
7. **FIGURA 7:** Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas (1 – 32 Hz) em corpos cavernosos de camundongos controles e falciformes (SCD) tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 6 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle..... 32
8. **FIGURA 8:** Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em corpos cavernosos de camundongos controles (CTL) e transgênicos para anemia falciforme (SCD) tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 animais. * P < 0.05 comparado com o grupo controle-

veículo. As curvas para à ACh nos grupos controle- veículo e SCD- veículo foram repetidas nos painéis B e C para melhor visualização dos resultados. 33

9. **FIGURA 9:** Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos de camundongos controles e falciformes (SCD) tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle..... 34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Anatomia, inervação e fisiologia da ereção peniana.....	14
1.2 Importância do óxido nítrico (NO) na ereção peniana.....	15
1.3 Anemia Falciforme.....	16
1.4 Priapismo	17
1.5 Camundongos transgênicos para anemia falciforme.....	18
1.6 Fisiopatologia do priapismo na anemia falciforme.....	18
1.7 Novo candidato a fármaco derivado do resveratrol e núcleo furoxânico para o tratamento da anemia falciforme.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVO GERAL	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. MATERIAIS E MÉTODOS	25
5.1 Animais	25
5.2 Grupos experimentais.....	25
5.3 Preparação da musculatura lisa cavernosa	25
5.4 Protocolos experimentais	27
5.5 Protocolos de relaxamento	27
5.6 Protocolos de relaxamento nitrérgico.....	27
5.7 Dados hematológicos	27
5.8 Análise estatística.....	27
6. RESULTADOS	29
6.1 O tratamento com o composto RVT-FxMe não modificou parâmetros hematológicos nos camundongos eNOS ^{-/-} e SCD.....	29

6.2 O tratamento com o composto RVT-FxMe reverteu o aumento do relaxamento nitrérgico nos corpos cavernosos dos camundongos eNOS ^{-/-}	30
6.3 O tratamento com o composto RVT-FxMe reverteu o aumento do relaxamento induzido pelo SNP nos corpos cavernosos dos camundongos eNOS ^{-/-}	31
6.4 O tratamento com o composto RVT-FxMe não modificou o aumento do relaxamento nitrérgico nos corpos cavernosos dos camundongos SCD.....	32
6.5 Relaxamento induzido pela acetilcolina em corpos cavernosos de camundongos falciformes: efeito do tratamento com o composto RVT-Fx-Me.....	33
6.6 O tratamento com o composto RVT-FxMe não modificou o aumento do relaxamento induzido pelo SNP nos corpos cavernosos dos camundongos SCD.....	34
7. DISCUSSÃO	35
8. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO I.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia, inervação e fisiologia da ereção peniana

A morfologia do pênis é similar em todos os mamíferos. O pênis do homem é formado por dois corpos cavernosos (CC) que possuem a forma cilíndrica e estão localizados na região dorsal e por um corpo esponjoso situado na região ventral, que abriga a uretra em seu interior e origina a glândula do pênis na região distal. Cada um dos CC é contornado pela túnica albugínea que é definida como uma membrana fibrosa e compacta, que é composta em por colágeno, assim como por fibras composta por elastina (MITIDIARI, 2008). Os CC são constituídos por espaços sinusoidais lacunares que são interligados e revestidos por células endoteliais. Os CC são conectados por um septo fenestrado, o que lhes possibilita funcionar como uma única unidade erétil (HSIEH, 2012; MITIDIARI, 2008).

O pênis possui inervação do sistema nervoso simpático e sistema nervoso para simpático e somática (fibras motoras e sensoriais). A estimulação do sistema simpático atua promovendo flacidez peniana e a estimulação da via parassimpática leva a ereção peniana (DEAN; LUE, 2005; EL-SAKKA; LUE, 2004; GIULIANO; RAMPIN, 2004). O suprimento sanguíneo para o pênis vem especialmente da artéria pudenda interna que se ramifica nas artérias cavernosa, uretral, dorsal e bulbar. As artérias cavernosas que adentram os corpos cavernosos se ramificam em artérias menores denominados helicinas. Essas artérias irrigam os espaços sinusoidais dos CC (MITIDIARI, 2008). O sangue que chega até o pênis é drenado por um complexo sistema de veias profundas e superficiais que são originadas entre a periferia do tecido peniano e a túnica albugínea (MITIDIARI, 2008).

O músculo liso das artérias do pênis e os sinusóides dos corpos cavernosos encontram-se contraídos em razão da estimulação de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, durante a flacidez peniana. No estado flácido, somente uma porcentagem de sangue entra nos CC para manter a nutrição do órgão (TRAISH et al., 1999). À medida que os sinusóides se contraem, o sangue sai dos CC para as veias fora do pênis. Assim, durante a flacidez peniana, os músculos lisos dos CC e das artérias dos CC estão contraídos (KIM et al., 1993). Quando a atividade do sistema nervoso simpático é bloqueada, esses músculos relaxam (tumescência), ocorrendo a entrada de sangue arterial e a elevação gradual da pressão intracavernosa. Assim, o relaxamento das artérias cavernosas e helicinas resulta no aumento do aporte sanguíneo para os espaços dos CC, promovendo a expansão peniana e aumento

da pressão intracavernosa. A expansão peniana faz com que ocorra o bloqueio do efluxo venoso no plexo venoso subtunial, assim ocorrendo o mecanismo de oclusão venosa, e finalmente, ereção peniana. A ativação das fibras simpáticas causa elevação no tônus do músculo dos CC e das artérias helicinais, causando diminuição do influxo sanguíneo arterial e redução da expansão dos corpos cavernosos (detumescência), com descompressão das veias no plexo venoso subtunial e a elevação do efluxo sanguíneo, fazendo com que o retorne para o estado de flácido. Em resumo, a ativação do nervo cavernoso resulta na ereção peniana, enquanto a ativação das fibras simpáticas resulta em flacidez peniana (ANDERSSON, 2011; BURNETT, 2019; MITIDIERI, 2008).

1.2. Importância do óxido nítrico (NO) na ereção peniana

O neurotransmissor óxido nítrico (NO) é importante no sistema de transdução de sinal que atua no pênis para mediar as respostas eréteis (HURT et al., 2002). A enzima responsável pela formação do NO é denominada óxido nítrico sintase (NOS) e está presente nos neurônios nitrérgicos (nNOS) e no endotélio sinusoidal que reveste os CC (eNOS). A nNOS e eNOS convertem a L-arginina em NO e L-citrulina (GRATZKE et al., 2010). Em ratos, camundongos e humanos, o plexo pélvico, nervo cavernoso, terminações nervosas do tecido erétil, nervo dorsal, plexo nervoso das artérias dorsal e cavernosa expressam a enzima nNOS (LEONE et al., 1994; MIZUSAWA et al., 2001). As células endoteliais também produzem e liberam NO em resposta à acetilcolina (ACh) no pênis (TEIXEIRA et al., 1998; TEJADA et al. 1988). A vasodilatação da artéria iniciada pela liberação de NO da nNOS resulta na liberação de NO das células endoteliais devido a elevação do fluxo sanguíneo (MUSICKI, 2011). Assim, a ereção peniana não parece ser totalmente induzida pelo NO dos nervos nitrérgicos. A elevação do fluxo sanguíneo induzido estimula a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) na célula endotelial, que fosforila a Akt, que fosforila e ativa a eNOS, resultando na produção de NO no endotélio (HURT KJ et al., 2002, 2012).

Sabe-se que o NO produzido migra para o músculo liso e ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), quando liberado das fibras nitrérgicas ou do endotélio (MÓNICA; ANTUNES, 2018). A GCs ativada promove a produção do segundo mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O GMPc elevado estimula a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), o que resulta na diminuição dos níveis de cálcio, e finalmente relaxamento do músculo liso e ereção peniana (Figura 1).

O GMPc é degradado em GMP pela enzima fosfodiesterase do subtipo 5 (PDE5), que interrompe a ereção peniana (ANDERSSON, 2011).

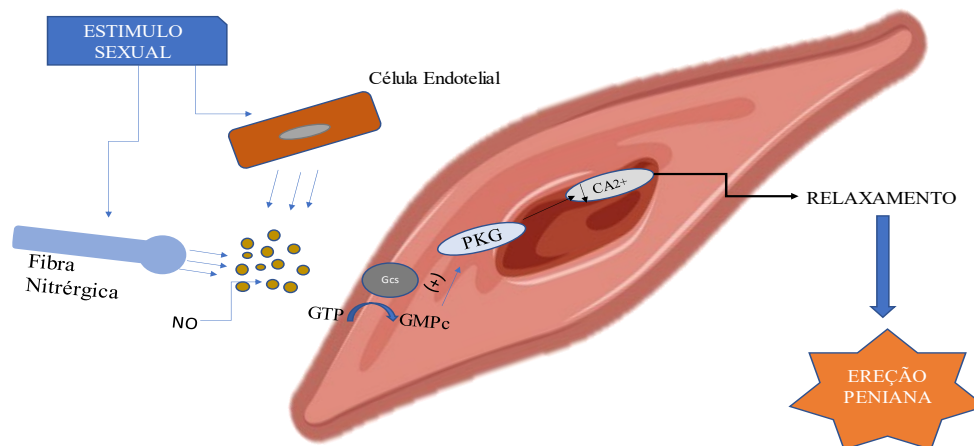


FIGURA 1: Sinalização NO/GCs/GMPc: Principal via de relaxamento do músculo liso cavernoso

1.3. Anemia Falciforme

A prevalência global da doença falciforme em 2010 foi estimada em 312.000 recém-nascidos e 5.476.000 recém-nascidos com traço falciforme (PIEL et al., 2013). Dados do Programa Nacional de Triagem Neonatal mostram que aproximadamente 3.000 crianças no Brasil sofrem de doença falciforme a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Devido à sua elevada prevalência, morbidade e mortalidade, a anemia falciforme é um importante problema de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Estima-se que existam 30.000 pessoas com doença falciforme no Brasil. Atualmente, o número de pessoas de todas as idades afetadas pela doença falciforme em todo o mundo é desconhecido por causa da falta de estudos epidemiológicos (KATO et al., 2018).

A principal alteração molecular na anemia falciforme é causada por uma única substituição de base no códon 6 do gene da beta globina, adenina (A) é substituída por timina (T) (KATO et al., 2018), resultando na produção de hemoglobina anormal, chamada hemoglobina S (HbS) (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Apenas HbS desoxigenada polimeriza, não HbS oxigenada (KATO et al., 2018). A alteração essencial na patogênese da doença é a polimerização da HbS que causa deformação das hemácias, gerando anemia hemolítica e a obstrução de vasos (Figura 2) (KATO et al., 2018). Estas alterações causam no paciente com anemia falciforme crise vaso-

oclusiva dolorosa, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda, hemorragia retiniana, necrose avascular, infecções, infarto esplênico, entre outras e complicações desenvolvidas mais tardiamente que incluem hipertensão pulmonar, úlceras de perna, priapismo e disfunção erétil decorrente do priapismo (ANELE et al., 2015; JOICE; LIU; BURNETT, 2021; KATO et al., 2018).

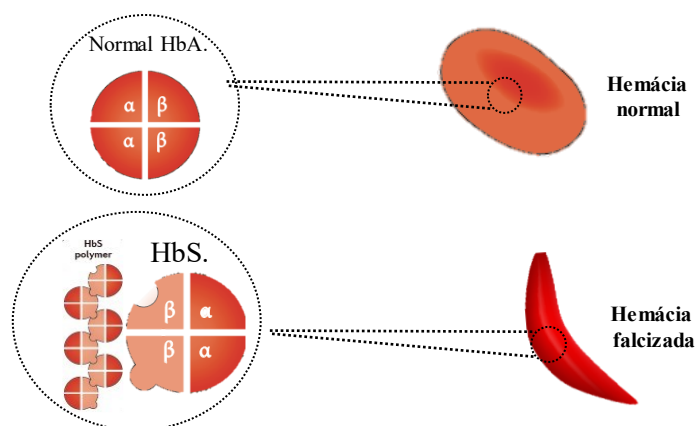


FIGURA 2: Polimerização da Hemoglobina S

1.4. Priapismo

O priapismo é caracterizado como uma ereção peniana persistente, prolongada, muitas vezes dolorosa, desencadeada ou não por estimulação, geralmente persistindo por mais de quatro horas (JOICE; LIU; BURNETT, 2021; SALONIA et al., 2014). O priapismo é classificado como priapismo isquêmico (veno-oclusivo ou baixo fluxo), intermitente (recorrente) ou não-isquêmico (arterial ou alto fluxo) (SALONIA et al., 2014).

O priapismo isquêmico é uma ereção persistente marcada pela rigidez dos corpos cavernosos e pouco ou nenhum influxo arterial para os corpos cavernosos. No priapismo isquêmico há alterações dependentes de tempo com hipóxia progressiva, hipercapnia e acidose. O paciente geralmente relata dor no pênis após 6 a 8 horas de ereção (BRODERICK et al., 2010).

O priapismo não-isquêmico é uma ereção persistente causada pelo aumento anormal do influxo arterial cavernoso. Normalmente, os corpos cavernosos estão tumescentes, mas não rígidos e o paciente não relata dor peniana (AHUJA et al., 2021).

O priapismo intermitente é determinado por episódios regulares de priapismo. Esta classificação de priapismo foi historicamente descrita como ereções penianas prolongadas

recorrentes e dolorosas em pacientes com anemia falciforme (Serjeant; Ceulaer; Maud, 1985). Os homens geralmente acordam com ereção que persiste por várias horas devido a ereção peniana noturna ou matinal. Os homens com anemia falciforme podem apresentar priapismo intermitente desde a infância; nesses pacientes, as ereções penianas prolongadas recorrentes podem aumentar em frequência e duração, assim progredindo para um episódio de priapismo isquêmico (03, ANELE et al., 2015; KATO, 2012).

O priapismo é considerado um importante problema clínico para os pacientes do sexo masculino com anemia falciforme. Esta condição é uma emergência urológica, pois o priapismo isquêmico acarreta alterações estruturais nos corpos cavernosos como fibrose peniana irreversível e danos nas células endoteliais e musculares lisas. Essas mudanças contribuem para os danos vasculares, causando disfunção erétil (JOICE; LIU; BURNETT, 2021; MUSICKI; BURNETT, 2020; MUSICKI et al., 2011). Estudos epidemiológicos têm evidenciado que 30-45% dos homens com doença falciforme desenvolvem episódios de priapismo isquêmico e 30% destes quadros evoluem para a disfunção erétil (ADEYOJU et al., 2002).

Apesar da elevada incidência, os tratamentos disponíveis atuam de forma aguda e não na prevenção do priapismo (JOICE; LIU; BURNETT, 2021). Dessa forma, trabalhos que atuem no desenvolvimento de novas terapias preventivas são de grande relevância clínica. Alternativas medicamentosas na intervenção do priapismo têm sido tema de muitos estudos, porém poucos apresentam resultados efetivos. Agonistas α -adrenérgicos foram testados de forma aguda, a fenilefrina, que proporciona a contração das musculaturas lisas das artérias dos corpos cavernosos e induz consequentemente o fluxo sanguíneo para a circulação venosa (VICARI; FIGUEIREDO, 1993).

1.5. Camundongos transgênicos para anemia falciforme

Camundongos transgênicos que expressam HbS foram produzidos, assim os estudos das alterações que ocorrem na anemia falciforme podem ser investigados neste modelo animal (PÁSZTY et al., 1997; WU et al., 2006). O modelo de camundongo transgênico para anemia falciforme Berkeley, apresenta a maioria das manifestações clínicas da anemia falciforme em humanos, incluindo o priapismo (BIVALACQUA et al., 2009; MUSICKI et al., 2020). O modelo de camundongo transgênico para anemia falciforme Townes é um outro modelo que foi desenvolvido através da substituição do gene da globina α murino pelo gene da globina α humano,

enquanto que o gene da globina β murino foi substituído pelos genes da globina γ and βS humano (WU et al., 2006). Assim como ocorre no modelo Berkeley, nosso grupo publicou que os camundongos transgênicos para anemia falciforme Townes também apresentam características de priapismo (SILVA et al., 2016).

1.6. Fisiopatologia do priapismo na anemia falciforme

Na anemia falciforme, estudos sugerem que o priapismo pode ser desencadeado pela obstrução do fluxo venoso causado pelas interações de hemácias falcizadas e diferentes tipos celulares, assim impedindo o efluxo venoso dos espaços sinusoidais dos corpos cavernosos, resultando em isquemia tecidual através do processo vaso-oclusivo. Porém, estudos atuais mostram que alterações moleculares nos corpos cavernosos também participam do priapismo isquêmico na anemia falciforme, além do mecanismo de vaso-oclusão (KATO et al., 2018; MUSICKI; BURNETT, 2020; MUSICKI et al., 2020; SILVA et al., 2016a,b). Paradoxalmente, a biodisponibilidade reduzida de NO endotelial nos CC tem sido identificada como uma das principais causas para o desenvolvimento do priapismo na anemia falciforme (CHAMPION et al., 2005; GLADWIN; SACHDEV, 2012; KATO; 2012; SILVA et al., 2016a,b). Na anemia falciforme, a redução na biodisponibilidade de NO está associado com hemólise intravascular, aumento do estresse oxidativo e aumento da atividade enzimática da arginase causando a redução do substrato L-arginina (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017; GLADWIN; SACHDEV, 2012).

Estudos experimentais mostram que a diminuição na biodisponibilidade basal de NO/GMPc leva a uma diminuição compensatória na expressão de PDE5 nos corpos cavernosos, prejudicando assim o mecanismo que controla a ereção do pênis (BIVALACQUA et al., 2012; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017; SILVA et al., 2016a,b). Portanto, quando o NO é produzido neuronalmente pela nNOS em resposta a um estímulo erétil in vivo, o GMPc acumula dentro da célula do músculo liso do corpo cavernoso tornando-o incontrolavelmente relaxado, assim, a ereção peniana persiste (priapismo) porque o GMPc não é degradado pela PDE5 (CHAMPION et al., 2005; OLUJOHUNGBE; BURNETT, 2013). Estudos anteriores sugerem que a normalização dos níveis basais de NO/GMPc podem restaurar a expressão/atividade da PDE5 e conseqüentemente o controle regulatório da ereção peniana (BURNETT, 2019; LAGODA et al., 2014; SILVA et al., 2016a,b). De fato, estudos funcionais in vitro mostraram aumento do relaxamento nitrérgico e do

relaxamento dependente e independente de endotélio em corpos cavernosos de camundongos transgênicos para anemia falciforme “Berkeley” e “Townes”, assim como redução na expressão da PDE5 (CHAMPION et al., 2005; CLAUDINO et al., 2009; SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2016a,b).

Os corpos cavernosos de homens e camundongos com anemia falciforme também apresentam aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que tem sido atribuído ao aumento da expressão da NADPH oxidase e eNOS desacoplada (ANELE et al., 2015; LAGODA et al., 2013; MUSICKI et al., 2011; SILVA et al., 2016a,b). Uma das consequências do aumento do estresse oxidativo na anemia falciforme é a inativação do NO pelas altas concentrações de ânion superóxido (O_2^-) (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). Outra causa em potencial que aumenta o relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos no priapismo são os níveis elevados de adenosina no pênis, que fazem com que os corpos cavernosos estejam em um estado cronicamente relaxado (BIVALACQUA et al., 2010; NING et al., 2014). A redução da atividade/expressão da via da rho-quinase (mediador contrátil) foi observada em corpos cavernosos de homens e camundongos com anemia falciforme (BIVALACQUA et al., 2010; LAGODA et al., 2013). Portanto, dois mecanismos moleculares distintos parecem atuar em conjunto no priapismo na anemia falciforme: aumento do relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos pelo GMPc desregulado e efeitos contráteis diminuídos da via da Rho-quinase.

Camundongos knockout para a enzima eNOS apresentam características de priapismo e aumento do relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso, assim como redução na expressão da PDE5 e aumento do estresse oxidativo no pênis (CHAMPION et al., 2005; NANGLE; COTTER; CAMERON, 2004; SILVA et al., 2016a,b). Os estudos com esses animais indicam que a disfunção da enzima eNOS no pênis é uma importante alteração para desencadear o priapismo (CHAMPION et al., 2005; LAGODA et al., 2014; MUSICKI et al., 2020). Assim como nos camundongos falciformes, a baixa biodisponibilidade do NO endotelial está associada com a menor expressão/atividade da PDE5 no pênis (CHAMPION et al., 2005). Um trabalho publicado pelo nosso grupo mostrou que o tratamento com um novo composto doador de NO híbrido derivado da talidomida e hidroxiuréia (composto 4C) normaliza a expressão da PDE5 no pênis e reverte o priapismo em camundongos transgênicos para anemia falciforme e em camundongos knockout

para as enzimas eNOS e nNOS, assim como o aumento do estresse oxidativo (SILVA et al., 2016a,b).

Tomados em conjunto, esses estudos sugerem que o priapismo isquêmico e recorrente resulta da baixa biodisponibilidade do NO endotelial, redução da atividade/expressão de PDE5, superprodução de adenosina e reduções na atividade de Rho-quinase, traduzindo-se em maior relaxamento do músculo liso dos corpos cavernosos e inibição da vasoconstrição no pênis.

1.7. Novo candidato a fármaco derivado do resveratrol e núcleo furoxânico para o tratamento da anemia falciforme

A hidroxiuréia foi a primeira droga aprovada pelo FDA para o tratamento da anemia falciforme. O tratamento com a hidroxiuréia reduz a morbidade e mortalidade associadas à anemia falciforme (COKIC et al., 2003; DAVIES; GILMORE, 2003; KATO et al., 2018; SCOTT, 1996; STEINBERG et al., 2003). Após o seu metabolismo, a hidroxiuréia atua como doador de NO, o qual parece ser o responsável por induzir aumento dos níveis de hemoglobina fetal (HbF) e pelos efeitos benéficos observados (COKIC et al., 2003). A HbF impede a polimerização da HbS desoxigenada e possui função semelhante à hemoglobina adulta (HUMPHRIES, 2014). Porém, aproximadamente 30% dos pacientes não respondem significativamente a terapia com a hidroxiuréia (HUMPHRIES, 2014). Em homens com priapismo, poucos estudos avaliaram os efeitos da hidroxiuréia (ANELE et al., 2014; SAAD et al., 2004). Até o momento não há estudos experimentais voltados à compreensão da hidroxiuréia no priapismo.

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-transetilbeno) é um produto natural estilbênico encontrado na planta *Polygonum cuspidatum*, usada na medicina popular oriental, e em cascas de uvas e em amendoins (PETROVSKI; GURUSAMY; DAS, 2021; TEIXEIRA et al., 1998). Estudos pré-clínicos relataram que o resveratrol tem efeitos protetores em vários modelos de doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (ANDERSSON, 2011; XIA et al., 2017). Estudos anteriores mostraram que o resveratrol possui a importante capacidade de induzir aumento de HbF, uma propriedade que é de valor para o tratamento da anemia falciforme (FIBACH et al., 2012; RODRIGUES et al., 2001). Além disso, o resveratrol também desempenha atividade antioxidante potente em diversos modelos animais (QIN et al., 2012; TAYLOR et al., 1979). Em modelos animais de disfunção erétil, o tratamento com o resveratrol restaurou a função

endotelial e reduziu o estresse oxidativo em corpos cavernosos (MURAT et al., 2016; YAZIR et al., 2018; YU et al., 2013).

O composto (E)-4-(4-(4-metoxiestiril)fenoxi)-3-metil-1,2,5-oxadiazol 2-óxido (RVT-FxMe, Protocolo de Patente nº BR 1020160172438, Figura 3) é derivado do resveratrol contendo em sua estrutura uma subunidade doadora de NO (BOSQUESI et al., 2020). Recentemente, nosso grupo observou que o composto RVT-FxMe administrado por via oral em camundongos apresenta atividade anti-inflamatória e analgésica in vivo e reduziu em até 64,3% os níveis de TNF- α no sobrenadante de macrófagos previamente estimulados com LPS (BOSQUESI et al., 2020). O RVT-FxMe também induziu a produção de cadeias de gama globina (γ G + γ A) em células CD34⁺ de humanos saudáveis, demonstrando potencial para induzir hemoglobina fetal, que é uma importante intervenção terapêutica para anemia falciforme. Além disso, o RVT-FxMe não é mutagênico e genotóxico, representando um novo protótipo para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme (BOSQUESI et al., 2020).

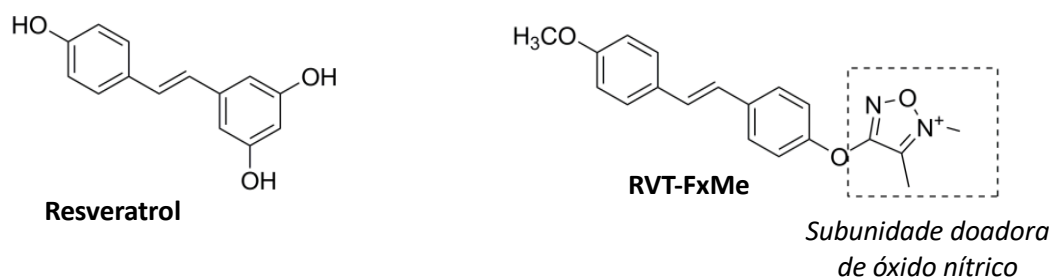


FIGURA 3: Estrutura química do resveratrol e RVT-FxMe.

2. JUSTIFICATIVA

O priapismo constitui importante problema de saúde para crianças e adultos com anemia falciforme. Esta alteração é uma emergência urológica e os tratamentos farmacológicos que estão no mercado agem de forma aguda e são administrados após um longo período de ereção instalada, assim prejudicando o tecido erétil. Quando os agentes farmacológicos disponíveis não são eficientes, é obrigatório submeter o paciente ao tratamento cirúrgico, pois o priapismo não resolvido pode causar disfunção erétil permanente (JOICE; LIU; BURNETT, 2021; MUSICKI; BURNETT, 2020). Devido à falta de drogas disponíveis para prevenir os sintomas da anemia falciforme, o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos (UNESP-Araraquara-SP) (2012) tem sintetizado novos compostos com o objetivo de tratar as alterações causadas pela anemia falciforme. Dos Santos e colaboradores demonstraram que doadores de NO, a exemplo dos ésteres de nitratos orgânicos e furoxanos, possuem efeitos benéficos para o tratamento da anemia falciforme, podendo representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da doença (JL et al., 2011; JL et al., 2012). Recentemente, o composto mais promissor sintetizado pelo nosso grupo é o composto RVT-FxMe que possui propriedade doadora de NO (Pedido de Patente nº BR 1020160172438, Figura 3) (BOSQUESI et al., 2020). Como mencionado acima, uma causa potencial implicada nos episódios de priapismo desenvolvidos devido a anemia falciforme é a biodisponibilidade reduzida do NO. Idealmente, as novas estratégias de prevenção devem atuar nas bases fisiopatológicas da doença. Portanto, agentes doadores de NO, como RVT-FxMe, podem ser uma ótima alternativa para o tratamento do priapismo na anemia falciforme. O presente projeto, ao propor um novo doador de NO como uma nova abordagem terapêutica, poderá ter repercussão positiva, visto que não existe tratamento adequado para a prevenção do priapismo. Para tanto, utilizaremos camundongos transgênicos para anemia falciforme e camundongos deficientes para a eNOS para avaliar o novo composto RVT-FxMe.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito farmacológico do tratamento crônico com o novo composto doador de NO RVT-FxMe, visando restaurar as alterações da função erétil em camundongos transgênicos para a anemia falciforme e eNOS^{-/-}.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Determinar os parâmetros hematológicos nos camundongos controles, falciformes e eNOS^{-/-} tratados com o composto RVT-FxMe ou veículo;

II. Quantificar a hemoglobina plasmática nos camundongos controles, falciformes e eNOS^{-/-} tratados com o composto RVT-FxMe ou veículo;

III. Avaliar o relaxamento induzido pela ACh, nitroprussiato de sódio, assim como o relaxamento nitrérgico em corpos cavernosos de camundongos controles e falciformes tratados com o composto RVT-FxMe ou veículo;

VI. Avaliar o relaxamento induzido pela ACh, nitroprussiato de sódio, assim como o relaxamento nitrérgico em corpos cavernosos de camundongos controles e eNOS^{-/-} tratados com o composto RVT-FxMe ou veículo;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos machos transgênicos para a anemia falciforme, expressando exclusivamente hemoglobinas humanas (PÁSZTY et al., 1997; WU et al., 2006), camundongos knockout para a enzima eNOS (CLAUDINO et al., 2009) e camundongos C57BL/6 (controles) foram utilizados para o estudo, cada animal possuía 3 meses de vida. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos à 24°C em ciclos de claro/escuro (12/12 h), com ração e água ad libitum no biotério do Hemocentro da UNICAMP. Os protocolos experimentais encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP (4702-1/2017) e (5729-1/2021). Este método foi reproduzido de estudo anterior realizado pelo nosso grupo (SILVA, 2014).

5.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n = 5 cada), como se segue:

(1) Controle + Veículo: camundongos C57BL/6 que receberam apenas o veículo (Cremofor 20%, IP) por 2 semanas;

(2) Controle + RVT-FxMe: camundongos C57BL/6 que receberam apenas o RVT-Fx-Me (25 mg/Kg/dia, IP) por 2 semanas;

(3) eNOS^{-/-} + Veículo: camundongos knockout para a enzima eNOS que receberam apenas o veículo (Cremofor 20%, IP) por 2 semanas;

(4) eNOS^{-/-} + RVT-FxMe: camundongos knockout para a enzima eNOS que receberam apenas o RVT-FxMe (25 mg/Kg/dia, IP) por 2 semanas;

(5) SCD + Veículo: camundongos machos transgênicos para a anemia falciforme que receberam apenas o veículo (Cremofor 20%, IP) por 2 semanas;

(6) SCD + RVT-FxMe: camundongos machos transgênicos para a anemia falciforme que receberam apenas o RVT-Fx-Me (25 mg/Kg/dia, IP) por 2 semanas;

5.3 Preparação da musculatura lisa cavernosa

Este método foi reproduzido de estudo anterior realizado pelo nosso grupo (83). Os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). O pênis foi removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit gelada na seguinte composição (mM): NaCl, 130; NaHCO₃, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄·H₂O, 1.17 and CaCl₂·2H₂O, 1.6. Após a remoção da veia dorsal, uretra, tecidos conectivos e glândula peniana, os corpos cavernosos foram isolados a partir da extremidade proximal após secção do septo fibroso que os conecta. Desta forma, dois segmentos de corpo cavernoso (1.0 x 0.3 x 0.2 cm) foram obtidos de cada animal. Os tecidos foram montados em banhos para órgão isolado (7 ml) preenchidas com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerada com O₂:CO₂ (95:5%) e mantida à temperatura de 37°C (pH 7.4). Os segmentos de corpo cavernoso foram então suspensos entre um transdutor de força e uma unidade fixa. A tensão aplicada aos tecidos (2,0 mN) foi periodicamente ajustada até estabilização (60 min) e a solução nutritiva trocada a cada 15 minutos durante este período. As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) e registradas em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 7.0, AD Instruments, Austrália). Para estimulação elétrica dos nervos autonômicos (EFS), os tecidos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos paralelamente. A estimulação elétrica foi induzida através de um estimulador Grass S88 (Astro-Med Industrial Park, EUA), pela geração de pulsos de 1 ms de duração a 50 V em frequências variadas (1-32 Hz).

Os gráficos foram traçados e analisados através do programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores de potência e respostas máximas foram calculados pela seguinte equação (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA):

$E = E_{max} / [1 + (10^c / 10^x)^N + \Phi]$, onde E é elevação do tônus basal, E_{max} é a máxima resposta que o agonista pode produzir, “c” é o logaritmo da EC₅₀, que é a concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima; “x” é o logaritmo da concentração do agonista, o expoente, “N”, significa a inclinação da curva concentração-resposta e Φ é a resposta observada na ausência do agonista. As análises de regressões não lineares para determinar os parâmetros E_{max}, log EC₅₀ e o “n” foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

5.4 Protocolos experimentais

5.4.1 Protocolos de relaxamento

Para analisar a resposta relaxante dos corpos cavernosos, foi realizada a pré-contração tecidual com fenilefrina (10 μ M para o grupo controle e 3 μ M para o grupo eNOS^{-/-}). Após a estabilização da resposta contrátil (sem variações na tensão), foram construídas curvas concentração-resposta nos corpos cavernosos ao agonista muscarínico acetilcolina (1 nM - 10 μ M) e ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP; 10 nM - 10 μ M). Foram determinadas a potência (pEC₅₀) e a resposta máxima (E_{max}) em todos os protocolos descritos acima. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10 μ M), que foi tomada como 100%.

5.4.2 Protocolos de relaxamento nitrérgico

Para o estudo da estimulação elétrica (EFS), os corpos cavernosos foram montados entre dois eletrodos de platina dispostos de forma paralela. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 50 V, com duração dos pulsos de 1 milissegundo, intervalo entre os pulsos de 0,2 ms, duração da estimulação de 10 segundos nas frequências de 1, 2, 4, 8, 16 e 32 Hz com intervalo de 3 minutos entre os estímulos, conforme nossa experiência prévia.

As respostas relaxantes à estimulação elétrica (EFS, 1-32 Hz) foram obtidas em tecidos previamente tratados com guanetidina (30 μ M) para depletar os estoques de noradrenalina, e atropina (1 μ M) para bloquear a resposta muscarínica. Em seguida, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M) para construção da curva frequência-resposta (1-32 Hz).

5.5 Dados hematológicos

A leitura do hemograma foi processada no Beckman Coulter Ac.T diffTM Analyzer. As amostras de plasma foram utilizadas para a quantificação de hemoglobina livre plasmática através de ensaio colorimétrico, utilizando-se kit comercial seguindo as instruções do fabricante (Hemoglobin Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical).

5.6 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão das médias (E.P.M.) de n experimentos indicados em cada caso. Para comparação dos grupos foi usado o teste de análise de

variância (ANOVA- uma via), seguido pelo teste de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 O tratamento com o composto RVT-FxMe não modificou parâmetros hematológicos nos camundongos eNOS^{-/-} e SCD.

Os camundongos controle, eNOS^{-/-} e transgênicos para anemia falciforme Townes foram tratados com o veículo ou com o composto RVT-Fx-Me (25 mg/Kg/dia) por 2 semanas. Os parâmetros hematológicos apresentados na Figura 4 mostram que os camundongos falciformes (SCD) tratados com o veículo (SCD+veículo) e o composto RVT-Fx-Me (SCD+RVT-Fx-Me) apresentam anemia severa em comparação com os camundongos controles e eNOS^{-/-} tratados com o veículo ou RVT-Fx-Me (Figura 4A, 4B). Os valores de hemoglobina plasmática foram significativamente maiores no grupo SCD+veículo e SCD+RVT-Fx-Me em comparação com os dos grupos controles e eNOS^{-/-} tratados com o veículo ou RVT-Fx-Me (Figura 4C).

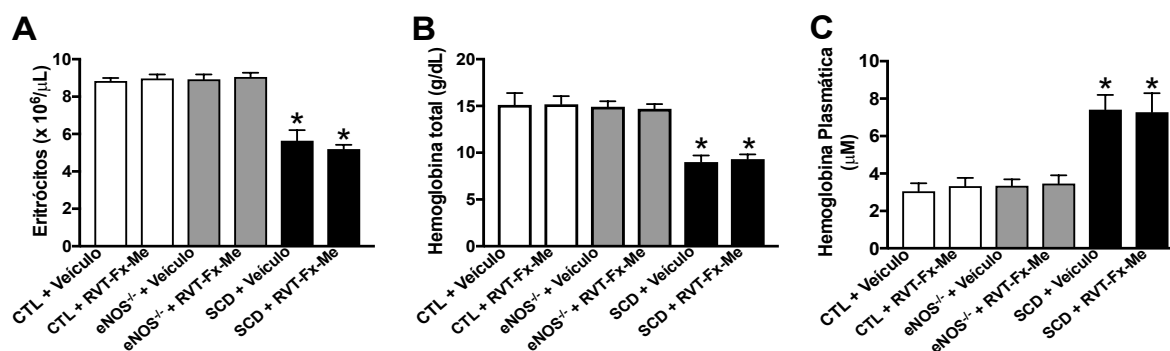


FIGURA 4: Parâmetros hematológicos em camundongos controle, eNOS^{-/-} e falciformes (SCD) tratados com o veículo ou com composto RVT-Fx-Me. (A) Eritrócitos, (B) hemoglobina total e (C) hemoglobina plasmática. Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 8 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle-Veículo.

6.2 O tratamento com o composto RVT-FxMe reverteu o aumento do relaxamento nitrérgico nos corpos cavernosos dos camundongos eNOS^{-/-}

A estimulação elétrica da preparação induziu relaxamentos frequência-dependentes (1-32 Hz). Os relaxamentos nitrérgicos foram significativamente maiores nos corpos cavernosos de camundongos eNOS^{-/-} em todas as frequências estudadas (Figura 5). O tratamento com o composto RVT-FxMe restaurou totalmente os relaxamentos nitrérgicos do grupo eNOS^{-/-} (Figura 5). No grupo controle o relaxamento nitrérgico não foi modificado com o tratamento com o RVT-FxMe (Figura 5).

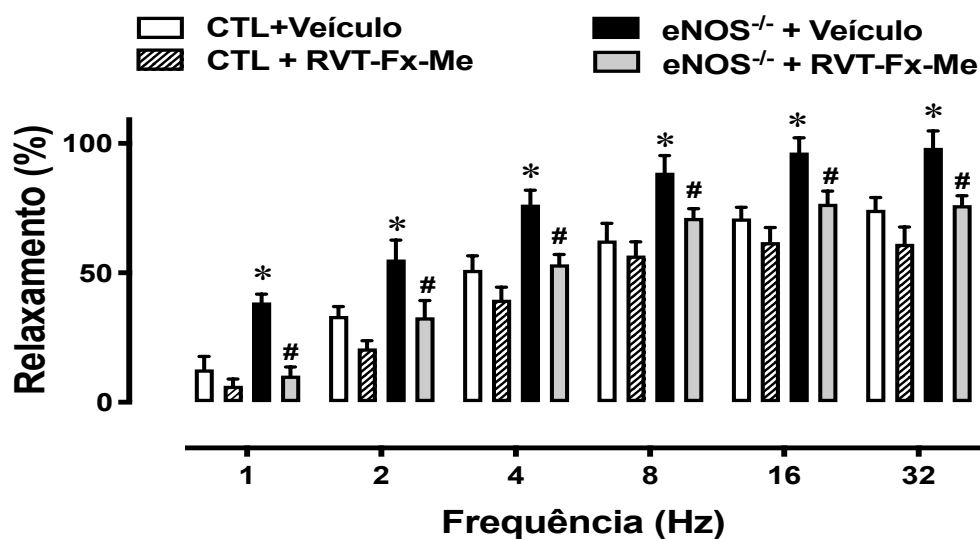


FIGURA 5: Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas (1 – 32 Hz) em corpos cavernosos de camundongos controles e eNOS^{-/-} tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 5 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle; #P < 0.05 comparado com o grupo eNOS^{-/-}-Veículo.

6.3 O tratamento com o composto RVT-FxMe reverteu o aumento do relaxamento induzido pelo SNP nos corpos cavernosos dos camundongos eNOS^{-/-}

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM – 10 μM) em corpos cavernosos de camundongos pré-contraídos com fenilefrina (10 μM - 3 μM) (Figura 6A-6C). A resposta máxima (E_{max}; Figura 6D) e a potência (pEC₅₀; Figura 4E) do SNP foram significativamente maiores ($P < 0.05$) nos corpos cavernosos do grupo eNOS^{-/-}-veículo em comparação o grupo controle-veículo. O tratamento com o composto RVT-FxMe normalizou totalmente ($P < 0.05$) os valores de resposta máxima (Figura 6D) e potência (Figura 6E) do SNP nos corpos cavernosos do grupo eNOS^{-/-} para valores semelhantes do grupo controle. Os valores de potência (Figura 6E) e a resposta máxima (Figura 6D) do SNP não foram alterados nos corpos cavernosos dos camundongos controles tratados com o composto RVT-FxMe (Figura 6C).

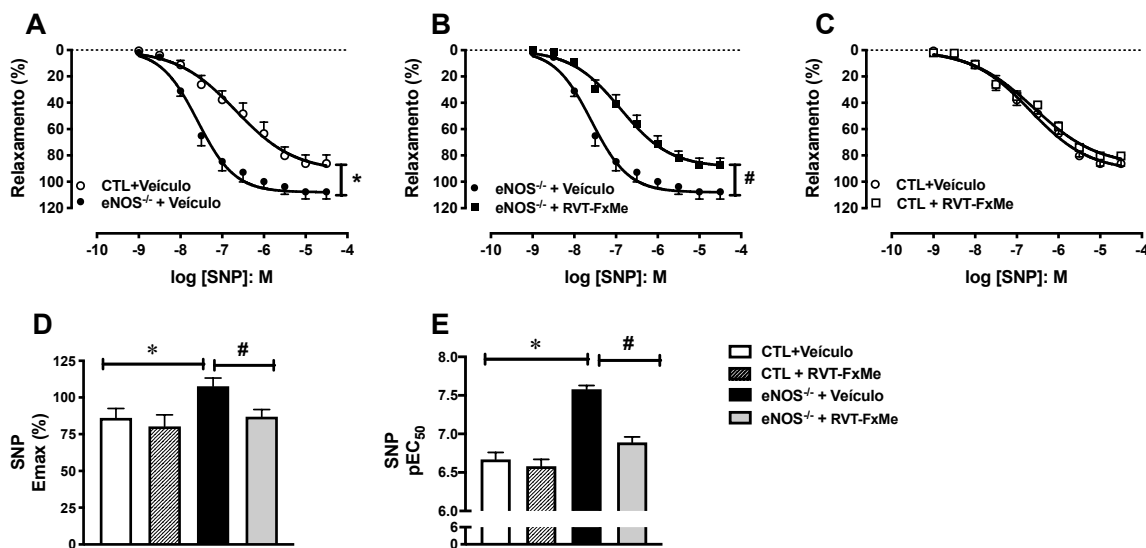


FIGURA 6: (A-C) Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos de camundongos controles e eNOS^{-/-} tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. (D) Valores de resposta máxima (E_{max}) e (E) potência (pEC₅₀) do SNP. Os dados representam as médias ± erro padrão da média de 5 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo controle; # $P < 0.05$ comparado com o grupo eNOS^{-/-}.

6.4 O tratamento com o composto RVT-FxMe não modificou o aumento do relaxamento nitrérgico nos corpos cavernosos dos camundongos SCD

A estimulação elétrica da preparação induziu relaxamentos frequência-dependentes (1-32 Hz) em todos os grupos estudados. Os relaxamentos nitrérgicos foram significativamente maiores nos corpos cavernosos de camundongos SCD nas frequências de 1-4 Hz (Figura 7). O tratamento com o composto RVT-Fx-Me não modificou no grupo SCD (Figura 7).

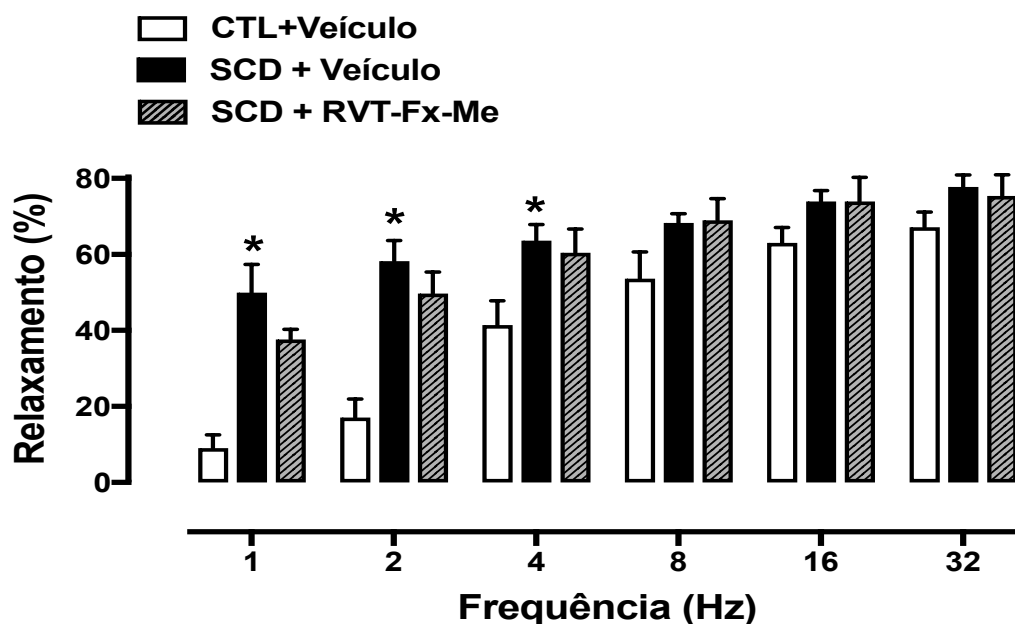


FIGURA 7: Relaxamentos de corpos cavernosos induzidos por estimulações elétricas (1 – 32 Hz) em corpos cavernosos de camundongos controles e falciformes (SCD) tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 6 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo controle.

6.5 Relaxamento induzido pela acetilcolina em corpos cavernosos de camundongos falciformes: efeito do tratamento com o composto RVT-Fx-Me

O relaxamento dependente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito à acetilcolina (1 nM – 10 μ M) em corpos cavernosos de camundongos pré-contráídos com fenilefrina (3-10 μ M). A resposta máxima (E_{max}) da acetilcolina foi significativamente ($P < 0.05$) maior nos corpos cavernosos do grupo SCD em comparação com o grupo controle (Figura 8A e 8D). O tratamento com o composto RVT-Fx-Me não modificou a resposta máxima (Figura 8D) da acetilcolina no grupo controle e falciforme.

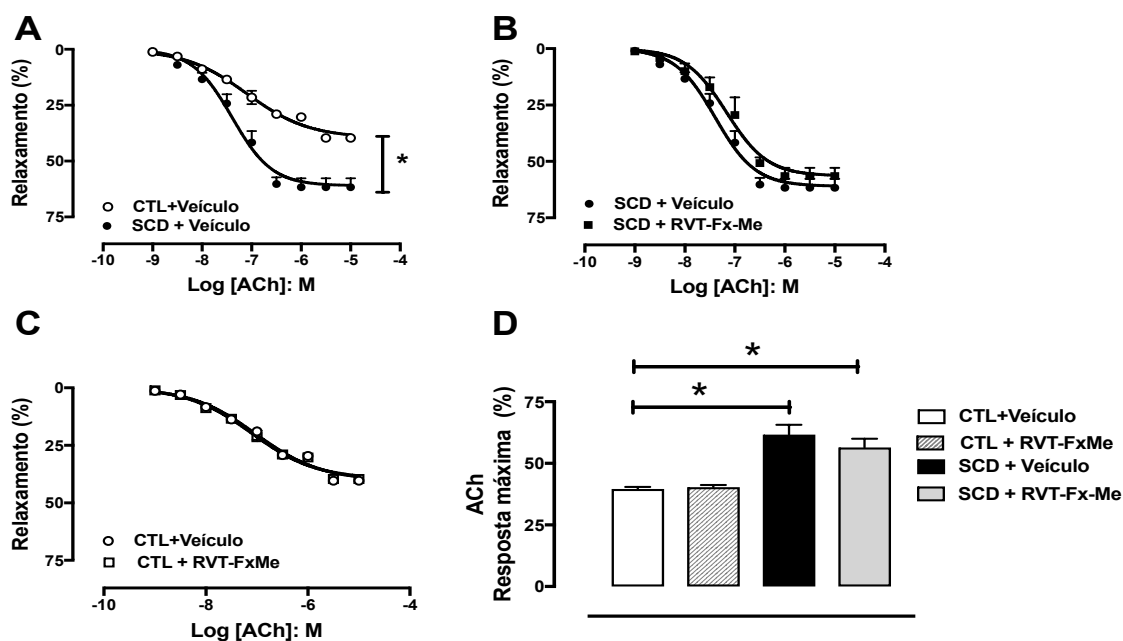


FIGURA 8: Curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh) em corpos cavernosos de camundongos controles (CTL) e transgênicos para anemia falciforme (SCD) tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 animais. * $P < 0.05$ comparado com o grupo controle-veículo. As curvas para à ACh nos grupos controle-veículo e SCD-veículo foram repetidas nos painéis B e C para melhor visualização dos resultados.

6.6 O tratamento com o composto RVT-FxMe não modificou o aumento do relaxamento induzido pelo SNP nos corpos cavernosos dos camundongos SCD

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM – 10 μ M) em corpos cavernosos de camundongos pré-contraídos com fenilefrina (3-10 μ M). Nos corpos cavernosos dos camundongos transgênicos para a anemia falciforme, os valores de resposta máxima (Figura 9C) e potência (Figura 9D) do SNP foram significativamente maiores em comparação com o grupo controle (Figura 9A). O tratamento com o composto RVT-Fx-Me não modificou os valores de potência e a resposta máxima maiores do SNP no grupo falciforme (Figura 9A, 9B e 9C).

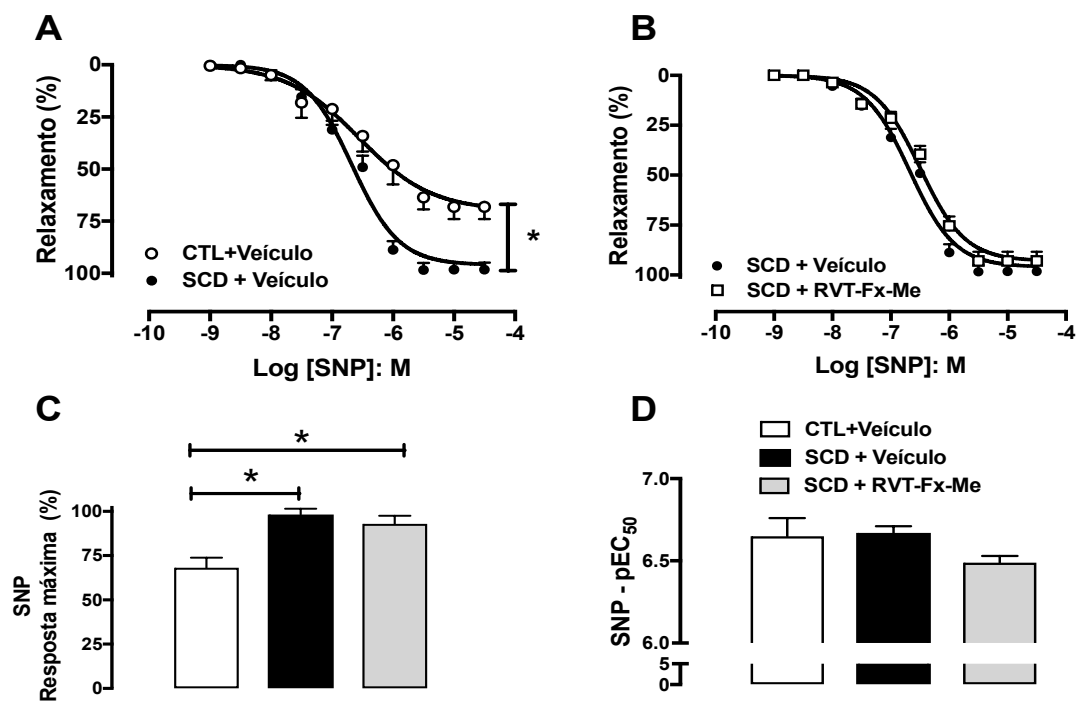


FIGURA 9: Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP) em corpos cavernosos de camundongos controles e falciformes (SCD) tratados com o composto RVT-Fx-Me ou veículo. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 animais. *P < 0.05 comparado com o grupo controle.

7. DISCUSSÃO

A anemia falciforme é uma das doenças hematológicas hereditárias mais comum em todo o mundo, com aproximadamente 300.000 novos nascimentos afetados por ano. Tanto crianças e adultos apresentam priapismo, uma complicação ainda não completamente elucidada (PIEL et al., 2013). Entretanto, nos últimos anos diversos estudos experimentais mostraram que a baixa biodisponibilidade de NO conduz para o desenvolvimento do priapismo em camundongos falciformes e knockouts para a eNOS (CHAMPION et al., 2005; LAGODA et al., 2014; MUSICKI et al., 2018; MUSICKI et al., 2020). Portanto, considerando que o composto RVT-FxMe possui propriedade doadora de NO (BOSQUESI et al., 2020), decidimos avaliar o efeito do tratamento com o RVT-FxMe sobre o priapismo em dois modelos animais que apresentam baixa biodisponibilidade de NO, camundongos eNOS^{-/-} e camundongos transgênicos para anemia falciforme.

O NO nitrérgico é considerado o principal mediador do relaxamento neurogênico do músculo liso peniano (ADEYOJU, 2002). Estudo prévio mostrou que o endotélio sinusoidal dos corpos cavernosos também libera NO em resposta à acetilcolina (TEJADA et al., 1988). Entretanto, a remoção do endotélio sinusoidal do tecido cavernoso não previne o relaxamento nitrérgico (IGNARRO et al., 1990; KIM et al., 1993), sendo aceito atualmente que o endotélio sinusoidal, através da liberação de NO, apenas auxilie a ereção peniana (HURT et al., 2012). É provável que o NO liberado das fibras nitrérgicas atua no início do processo de ereção peniana, enquanto o NO derivado do endotélio concomitantemente com o NO nitrérgico atua na sustentação do processo erétil (HURT et al., 2002; HURT et al., 2012). Desta forma, decidimos investigar o relaxamento de corpos cavernosos induzido pela ACh e pela estimulação das fibras nitrérgicas em nosso estudo. Uma vez que os camundongos knockout para eNOS não possuem eNOS no endotélio, nós não realizamos o relaxamento induzido pela acetilcolina nestes animais. Observamos que a resposta relaxante induzida pela EFS foi maior nos camundongos eNOS^{-/-}, indicando um fenótipo de priapismo. O tratamento com o RVT-FxMe reverteu o aumento do relaxamento nitrérgico no grupo eNOS^{-/-}. Consistente com nossos resultados funcionais, estudos anteriores mostraram a menor expressão de PDE5 nos corpos cavernosos de camundongos eNOS^{-/-}. É provável que o tratamento com o RVT-FxMe esteja normalizando a biodisponibilidade de NO-GMPc no músculo liso cavernoso e conseqüentemente a expressão de PDE5 no corpo cavernoso dos camundongos eNOS-

/-. Isso é consistente com um estudo molecular que relatou que um composto doador NO aumenta a expressão de PDE5 no pênis de camundongos SCD e eNOS^{-/-} (LAGODA et al., 2014).

O NO pode ser fornecido exogenamente aos tecidos e células por compostos geradores de NO. O composto inorgânico SNP é um agente que libera NO em sistemas biológicos por mecanismos não enzimáticos e enzimáticos (BONAVENTURA et al., 2008; Kowaluk; Seth; Fung, 1992). Em nosso estudo, os relaxamentos dos corpos cavernosos induzidos pelo SNP foram significativamente maiores no grupo eNOS^{-/-}. O tratamento com RVT-FxMe por duas semanas também restaurou o relaxamento induzido pela SNP. Portanto, é provável que o aumento no relaxamento induzido pelo SNP é resultado do acúmulo excessivo de GMPc no músculo liso do corpo cavernoso devido à menor degradação de GMPc pela PDE5 nos camundongos eNOS^{-/-}, assim favorecendo a resposta erétil exagerada.

Em nosso estudo, os corpos cavernosos dos camundongos falciformes mostraram aumento da resposta relaxante induzida pela ACh, EFS e SNP, de acordo com estudos prévios (CLAUDINO et al., 2009; SILVA et al., 2016;). O aumento das respostas relaxantes estimuladas pela via NO-GMPc está associada com a redução da expressão da PDE5 no tecido erétil de camundongos e homens com anemia falciforme (LAGODA et al., 2013; MUSICKI et al., 2018; SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2016a,b). Tratamentos farmacológicos experimentais que normalizaram a expressão de PDE5 nos corpos cavernosos de camundongos falciformes também reverteram o quadro de priapismo (MUSICKI et al., 2020; SILVA et al., 2016a,b). O tratamento com o RVT-FxMe por duas semanas não alterou as respostas relaxantes para ACh, EFS e SNP nos corpos cavernosos do grupo falciforme.

Na anemia falciforme, está bem estabelecido que o processo de hemólise intravascular acarreta a liberação de hemoglobina para o plasma à medida que os eritrócitos se rompem (KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017). No plasma sanguíneo, a haptoglobina se liga à hemoglobina livre formando um complexo, que é metabolizado pelos macrófagos no sistema reticuloendotelial (SCHAER et al., 2016). No entanto, na anemia falciforme, altas concentrações de hemoglobina são liberadas no plasma, saturando a haptoglobina e, assim, acumulando hemoglobina livre no plasma (SCHAER et al., 2013). A oxiemoglobina (HbFe²⁺) no plasma ou no espaço intersticial reage com o NO, gerando nitrato (NO³⁺) e metahemoglobina (HbFe³⁺) (REITER et al., 2002; SCHAER et al., 2013). Em nosso estudo, é provável que o aumento da concentração de oxihemoglobina no plasma

esteja inativando o NO liberado pelo RVT-FxMe antes que este atinja a GCs nas células musculares lisas dos corpos cavernosos dos camundongos falciforme, assim prejudicando o seu efeito farmacológico.

Em condições fisiológicas, as ROS e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) são produzidas de maneira controlada e desempenham papéis importantes como mensageiros secundários em muitas vias de sinalização intracelular (TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019). O estresse oxidativo, o desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante do tecido, está aumentado no tecido pênis de pacientes (LAGODA et al., 2013) e camundongos (BURNETT, 2019; MUSICKI et al., 2018; MUSICKI et al., 2020; SILVA et al., 2016 a,b) com anemia falciforme. O aumento da produção de ROS no pênis de camundongos falciformes foi atribuído ao aumento da expressão da NADPH oxidase, ativação de xantina oxidase e desacoplamento da eNOS (BURNETT, 2019; MUSICKI et al., 2012; SILVA et al., 2016 a,b). Em nosso estudo, também é provável que o aumento da produção de O_2^- esteja inativando o NO liberado pelo RVT-FxMe antes que este atinja a GCs nas células musculares lisas dos corpos cavernosos dos camundongos falciformes.

8. CONCLUSÃO

Em suma, nossos resultados mostraram que o tratamento com o composto RVT-FxMe reverte as alterações funcionais da via NO-GMPc em corpos cavernosos de camundongos eNOS^{-/-}, mas não nos camundongos transgênicos para anemia falciforme. É provável que o aumento da concentração de hemoglobina no plasma esteja inativando o NO liberado pelo RVT-FxMe antes que este atinja a GCs nas células musculares lisas dos corpos cavernosos dos camundongos falciforme, assim prejudicando o seu efeito farmacológico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEYOJU A.B. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications—an international multicentre study. **BJU international**. 2002;90, n. 9:898–902,.
2. ADEYOJU A.B; OLUJOHUNGBE A.B.K; MORRIS J; YARDUMIAN A; BAREFORD D; AKENOVA A. Priapism in sickle-cell disease; incidence, risk factors and complications - an international multicentre study. **BJU Int**. 2002;90;9:898–902.
3. AHUJA G.; IBECHEOZOR, C.; OKORIE, N. C.; JAIN, A. J.; COLEMAN, P. W., METWALLI, A. R., & Tonkin, J. B. Priapism and sickle cell disease: special considerations in etiology, management, and prevention. **Urology**, 2021, 156, e40-e47.
4. ANDERSSON K.E. Mechanisms of Penile Erection and Basis for Pharmacological Treatment of Erectile Dysfunction. **Pharmacol Rev**. 2011;63.4.:811–59
5. ANELE U.A; Le B.V; Resar L.M.S; BurnETT A.L. How I treat priapism. **Blood**. 2015;125(23):3551–8.
6. ANELE U.A; MACK A.K; RESAR L.M.S; BURNETT A.L. Hydroxyurea therapy for priapism prevention and erectile function recovery in sickle cell disease: a case report and review of the literature. **Int Urol Nephrol**. 2014;46(9):1733–6.
7. ANELE U.A; MORRISON B.F; REID M.E; MADDEN W; FOSTER S; BURNETT A.L. Overactive bladder in adults with sickle cell disease. **Neurourol Urodyn**. 2015.
8. ARICHI H. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc on lipid metabolism. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 1982;30, n. 5:1766–1770,.
9. BAUR J.A; PEARSON K.J; PRICE N.L; JAMIESON H.A; LERIN C; KALRA A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**. 2006;16;444(7117):337–42
10. BIVALACQUA T.J; Musicki B; Hsu L.L; Berkowitz D.E. Champion H.C; Burnett A.L. Sildenafil citrate-restored eNOS and PDE5 regulation in sickle cell mouse penis prevents priapism via control of oxidative/nitrosative stress. **PloS One**. 2013;8;7.
11. BIVALACQUA T.J; Musicki B; Hsu L.L; Gladwin M.T; Burnett A.L; Champion H.C. Establishment of a transgenic sickle-cell mouse model to study the pathophysiology of priapism. **J Sex Med**. 2009; (9):2494–504.
12. BIVALACQUA T.J; MUSICKI B; KUTLU O; BURNETT A.L. New insights into the pathophysiology of sickle cell disease-associated priapism. **J Sex Med**. 2012;
13. BIVALACQUA T.J; ROSS A.E; STRONG T.D; GEBSKA M.A; MUSICKI B; CHAMPION H.C. Attenuated RhoA/Rho-kinase signaling in penis of transgenic sickle cell mice. **Urology**. 2010;510; e7-12.
14. BONAVENTURA D; LUNARDI C.N; RODRIGUES G.J; NETO M.A; BENDHACK L.M. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide Biol Chem Off J Nitric Oxide Soc**. 2008;
15. BOSQUESI P.L; MELCHIOR A.C.B; PAVAN A.R; LANARO C; SOUZA C.M; RUSINOVA R. Synthesis and evaluation of resveratrol derivatives as fetal hemoglobin inducers. **Bioorganic Chem**. 2020;
16. BRODERICK G.A; KADIOGLU A; BIVALACQUA T.J; GHANEM H; NEHRA A; SHAMLOUL R. Priapism: pathogenesis, epidemiology, and management. **J Sex Med**. 2010. 1 Pt 2:476–500.
17. BURNETT A.L. The science and practice of erection physiology: story of a revolutionary gaseous molecule. **Trans Am Clin Climatol Assoc**. 2019;130:51–9.

18. BURNS J; YOKOTA T; ASHIHARA H; LEAN M.E.J; CROZIER A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. **J Agric Food Chem.** 2002;
19. BURNETT A.L; ALLEN R.P; TEMPANY C.M; DOVER G.J; BRENDLER C.B. Evaluation of erectile function in men with sickle cell disease. **Urology.** 1995;45(4):657–63.
20. CHAMPION H.C; BIVALACQUA T.J; TAKIMOTO E; KASS D.A; BURNETT A.L. Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005;102;5:1661–6.
21. CLAUDINO M.A; FRANCO-PENTEADO C.F; CORAT M.A.F; GIMENES A.P; PASSOS L.A.C; ANTUNES E. Increased cavernosal relaxations in sickle cell mice priapism are associated with alterations in the NO-cGMP signaling pathway. **J Sex Med.** 2009; 8:2187–96.
22. COKIC V.P; SMITH R.D; BELESLIN-COKIC B.B; NJOROGÉ J.M; MILLER J.L; GLADWIN M.T. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **J Clin Invest.** 2003;111(2):231–9.
23. DAVIES S.C; GILMORE A. The role of hydroxyurea in the management of sickle cell disease. **Blood reviews.** 2003;17, n. 2:99–109,.
24. DEAN R.C; LUE T.F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urol Clin North Am.** 2005;(v;32(4):379–95, v).
25. DOS SANTOS J. L; LANARO C; LIMA, L. M; GAMBERO S; FRANCO-PENTEADO C. F; ALEXANDRE-MOREIRA M. S; CHUNG M. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. **J Med Chem.** 2011;54(16):5811–9.
26. DOS SANTOS J. L; LANARO C; CHELUCCI R. C; GAMBERO, S; BOSQUESI P. L; REIS, J. S; CHUNG M. C. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. part II: furoxan derivatives. **J Med Chem.** 2012;55(17):7583–92.
27. DULMOVITS B.M; APPIAH-KUBI A.O; PAPOIN J; HALE J; HE M; AL-ABED Y. Pomalidomide reverses γ -globin silencing through the transcriptional reprogramming of adult hematopoietic progenitors. **Blood.** 2016;127(11):1481–92.
28. EHMKE H; JÜNEMANN K.P; MAYER B; KUMMER W. Nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide colocalization in neurons innervating the human penile circulation. **Int J Impot Res.** 1995;7:147–56.
29. EL-SAKKA A.I; LUE T.F. Physiology of penile erection. **ScientificWorldJournal.** 2004;1:128–34.
30. FIBACH E; PRUS E; BIANCHI N; ZUCCATO C; BREVEGLIERI G; SALVATORI F. Resveratrol: Antioxidant activity and induction of fetal hemoglobin in erythroid cells from normal donors and β -thalassemia patients. **Int J Mol Med.** 2012;
31. GIULIANO F; RAMPIN O. Neural control of erection. **Physiol Behav.** 2004;83.2.:189–201.
32. GLADWIN MT, SACHDEV V. Cardiovascular abnormalities in sickle cell disease. **J Am Coll Cardiol.** 2012;59(13):1123–33.
33. GRATZKE C; ANGULO J; CHITALEY K; DAI Y.T; KIM N.N; PAICK J.S. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **J Sex Med.** 2010;J (1 Pt 2):445–75.
34. HEDLUND P; ALM P; ANDERSSON K.E. NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. **Br J Pharmacol.** 1999;
35. HSIEH C.H. Advances in understanding of mammalian penile evolution, human penile anatomy and human erection physiology: clinical implications for physicians and surgeons.

Medical Science Monitor: **International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**. 2012;18, n. 7:118.

36. HUMPHRIES C. Drug development: a complicated path. **Nature**. 2014;515(7526):S4-5.
37. HURT K.J; MUSICKI B; PALESE M.A; CRONE J.K; BECKER R.E; MORIARITY J.L. Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. In: **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002.
38. HURT K.J; SEZEN S.F; LAGODA G.F; MUSICKI B; RAMEAU G.A; SNYDER S.H. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. In: **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012.
39. IGNARRO L.J; BUSH P.A; BUGA G.M; WOOD K.S; FUKUTO J.M; RAJFER J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem Biophys Res Commun**. 1990;31;170(2):843–50.
40. JANG M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**. 1997;275, n. 5297:218–220,.
41. JOICE G.A; LIU J.L; BURNETT A.L. Medical Treatment of Recurrent Ischemic Priapism: A Review of Current Molecular Therapeutics and New Clinical Management Paradigm. **BJU Int**. 2021.
42. KATO G.J; PIEL F.B; REID C.D; GASTON M.H; OHENE-FREMPONG K; KRISHNAMURTI L. Sick cell disease. **Nat Rev Dis Primer**. 2018;
43. KATO G.J. Priapism in sickle-cell disease: a hematologist's perspective. **J Sex Med**. 2012;
44. Kato G.J; STEINBERG M.H; GLADWIN M.T; Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **J Clin Invest**. 2017;127. 3:750–60.
45. KIM N; VARDI Y.; PADMA-NATHAN; DALEY J; GOLDSTEIN ; TEJADA I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. **J Clin Invest**. 1993;91.2.:437–42.
46. KOWALUK E.A; SETH; FUNG H.L. Metabolic activation of sodium nitroprusside to nitric oxide in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther**. 1992;262(3):916–22.
47. LAGODA G; SEZEN S.F; CABRINI M.R; MUSICKI B; BURNETT A.L. Molecular analysis of erection regulatory factors in sickle cell disease associated priapism in the human penis. **J Urol**. 2013;189;2.:762–8.
48. LAGODA G; SEZEN S.F; HURT K.J; CABRINI M.R; MOHANTY D.K; BURNETT A.L. Sustained nitric oxide (NO)-releasing compound reverses dysregulated NO signal transduction in priapism. **FASEB J**. 2014;28;1;:76–84.
49. LEONE A.M; WIKLUND N.P; HÖKFELT T; BRUNDIN L; MONCADA S. Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. **Neuroreport**. 1994;6:733–6.
50. MEILER S.E; WADE M; KUTLAR F; YERIGENAHALLY S.D; XUE Y; MOUTOUH-DE PARSEVAL L.A. Pomalidomide augments fetal hemoglobin production without the myelosuppressive effects of hydroxyurea in transgenic sickle cell mice. **Blood**. 2011;118(4):1109–12.
51. MANFREDINI V; CASTRO S; WAGNER S; SILVEIRA BENFATO M. A fisiopatologia da anemia falciforme. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**. 2013;19(1/2):3–6.
52. MITIDIERI E. Pharmacology and perspectives in erectile dysfunction in man. **Pharmacology & Therapeutics**. 2020;208:107493.
53. MIZUSAWA H; HEDLUND P; HÅKANSSON A; ALM P; ANDERSSON K.E. Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. **Br J Pharmacol**. 2001;132.6:1333–41.

54. MÓNICA F.Z; ANTUNES E. Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase for urogenital disorders. **Nat Rev Urol**. 2018;
55. MOUTOUH-DE PARSEVAL L. A; VERHELLE D; GLEZER E; JENSEN-PERGAKES K; FERGUSON G. D; CORRAL, L. G; CHAN K. Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells. **J Clin Invest**. 2008;
56. MURAT N; KORHAN P; KIZER O; EVCIM S; KEFI A; DEMIR O; ESEN A. A. Resveratrol protects and restores endothelium-dep Resveratrol Protects and Restores Endothelium-Dependent Relaxation in Hypercholesterolemic Rabbit Corpus Cavernosum. **J Sex Med**. 2016;
57. MUSICKI B; BURNETT A.L. Mechanisms underlying priapism in sickle cell disease: targeting and key innovations on the preclinical landscape. **Expert Opin Ther Targets**. 2020;
58. MUSICKI B; CHAMPION H.C; HSU L.L; BIVALACQUA T.J; BURNETT A.L. Post-translational inactivation of endothelial nitric oxide synthase in the transgenic sickle cell mouse penis. **J Sex Med**. 2011; 2:419–26.
59. MUSICKI B; KARAKUS S; AKAKPO W; SILVA F.H; LIU J; CHEN H. Testosterone replacement in transgenic sickle cell mice controls priapic activity and upregulates PDE5 expression and eNOS activity in the penis. **Andrology**. 2018.
60. MUSICKI B; KARAKUS S; LA FAVOR J.D; CHEN H; SILVA F.H; STURNY M. TSPO ligand FGIN-1-27 controls priapism in sickle cell mice via endogenous testosterone production. **J Cell Physiol**. 2020;
61. MUSICKI B; LIU T; SEZEN S.F; BURNETT A.L. Targeting NADPH oxidase decreases oxidative stress in the transgenic sickle cell mouse penis. **J Sex Med**. 2012;(8):1980–7.
62. NANGLE M.R; COTTER M.A; CAMERON N.E. An in vitro investigation of aorta and corpus cavernosum from eNOS and nNOS gene-deficient mice. **Pflug Arch Eur J Physiol**. 2004;;448(2):139–45.
63. NING C; WEN J; ZHANG Y; DAI Y; WANG W; ZHANG W. Excess adenosine A2B receptor signaling contributes to priapism through HIF-1 α mediated reduction of PDE5 gene expression. **FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol**. 2014;
64. Olujohungbe A; Burnett A.L. How I manage priapism due to sickle cell disease. **Br J Haematol**. 2013;160(6):754–65.
65. PÁSZTY C; BRION C.M; MANCI E; WITKOWSKA H.E; STEVENS M.E; MOHANDAS N. Transgenic knockout mice with exclusively human sickle hemoglobin and sickle cell disease. **Science**. 1997;278(5339):876–8.
66. PEREIRA P.S. Tratamento com a haptoglobina reverte alterações na função erétil associada ao priapismo em camundongos transgênicos para anemia falciforme. **Hematology, transfusion and cell therapy**. 2021;43:30– 31,.
67. PETROVSKI G; GURUSAMY N; DAS D.K. Resveratrol in cardiovascular health and disease. **Ann N Y Acad Sci**. 2011;
68. PIEL F.B; PATIL A.P; HOWES R.E; NYANGIRI O.A; GETHING P.W; DEWI M. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **Lancet Lond Engl**. 2013; 12;381. 9861:142–51.
69. QIN F; SIWIK D.A; LUPTAK I; HOU X; WANG L; Higuchi A. The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. **Circulation**. 2012;10;125(14):1757–64:1–6.
70. RATNA W.N; SIMONELLI J.A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sciences**. 2002;70, n. 13:1577–1589,.

71. REITER C.D; WANG X; TANUS-SANTOS J.E; HOGG N; CANNON R.O; SCHECHTER A.N. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat Med**. 2002; (12):1383–9.
72. RODRIGUE C.M; AROUS N; BACHIR D; SMITH-RAVIN J; ROMEO P.H; Galacteros F. Resveratrol, a natural dietary phytoalexin, possesses similar properties to hydroxyurea towards erythroid differentiation. **Br J Haematol**. 2001; 113(2):500–7.
73. SAAD S.T.O; LAJOLO C; GILLI S; MARQUES JÚNIOR J.F.C; LIMA C.S; COSTA F.F. Follow-up of sickle cell disease patients with priapism treated by hydroxyurea. **Am J Hematol**. 2004;77(1):45–9.
74. SALONIA A; EARDLEY I; GIULIANO F; HATZICHRISTOU D; MONCADA I; VARDI Y. European Association of Urology guidelines on priapism. **Eur Urol**. 2014; 65.2.:480–9.
75. SCHAER D.J; BUEHLER P.W; ALAYASH A.I; BELCHER J.D; VERCELLOTTI G.M. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blood**. 2013;121(8):1276–84.
76. SCHAER C.A; DEUEL J.W; SCHILDKNECHT D; MAHMOUDI L; GARCIA-RUBIO I; OWCZAREK C. Haptoglobin Preserves Vascular Nitric Oxide Signaling during Hemolysis. **Am J Respir Crit Care Med**. 2016; 15;193(10):1111–22.
77. SCOTT J.P. Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. **The Journal of pediatrics**. 1996;128, n. 6:820–828,.
78. SENER T.E; TAVUKCU H.H; ATASOY B.M; CEVIK O; KAYA O.T; CETINEL S. Resveratrol treatment may preserve the erectile function after radiotherapy by restoring antioxidant defence mechanisms, SIRT1 and NOS protein expressions. **Int J Impot Res**. 2018; (4):179–88.
79. SERJEANT G.R; CEULAER K; MAUDE G.H. Stilboestrol and stuttering priapism in homozygous sickle-cell disease. **Lancet Lond Engl**. 1985;2(8467):1274–6.
80. SILVA F.H; CLAUDINO M.A; CALMASINI F.B; ALEXANDRE E.C; FRANCO-PENTEADO C; BURNETT A.L. Sympathetic Hyperactivity, Increased Tyrosine Hydroxylase and Exaggerated Corpus Caverosum Relaxations Associated with Oxidative Stress Plays a Major Role in the Penis Dysfunction in Townes Sickle Cell Mouse. **PLoS One**. 2016;11;12.
81. SILVA F.H; KARAKUS S; MUSICKI B; MATSUI H; BIVALACQUA T.J; DOS SANTOS J.L. Beneficial effect of the nitric oxide donor compound 3-(1,3-dioxoisindolin-2-yl)benzyl nitrate on dysregulated phosphodiesterase 5, NADPH oxidase and nitrosative stress in the sickle cell mouse penis: implication for priapism treatment. **J Pharmacol Exp Ther**. 2016;
82. SILVA H.F. Papel do estresse oxidativo na disfunção erétil em ratos de meia-idade: prevenção por terapia antioxidante. **Tese Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas**. [s.n] 2014;
83. STEINBERG M.H; BARTON F; CASTRO O; PEGELOW C.H; BALLAS S.K; KUTLAR A. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA**. 2003;2;289(13):1645–51.
84. STEWART J.R; CHRISTMAN K.L; O'BRIAN C.A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. **Biochemical pharmacology**. 2000;60, n. 9:1355–1359,.
85. SUBBARAMAIAH K. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**. 1998;273, n. 34:21875–21882,.

86. TAYLOR N.E; GLOCKA P; LIANG M; COWLEY A.W. NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. **Hypertens Dallas Tex.** 1979;(4):692–8.
87. TEIXEIRA C.E; MORENO R.A; FERREIRA U; RODRIGUES NETTO N; FREGONESI A; ANTUNES E. Pharmacological characterization of kinin-induced relaxation of human corpus cavernosum. **Br J Urol.** 1998;81.3:432–6.
88. TEJADA I.S; R B; I G; K A; A M; RJ K. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. **Am J Physiol.** 1988;2. 459–467.
89. TEJERO J; SHIVA S; GLADWIN MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. **Physiol Rev.** 2019; 1;99(1):311–79.
90. THEODOROU A; PHYLACTIDES M; FORTI L; CRAMAROSSA M.R; SPYROU P; GAMBARI R. The investigation of resveratrol and analogs as potential inducers of fetal hemoglobin. **Blood Cells Mol Dis.** 2016;
91. TRAISH A.M; KIM N.N; GOLDSTEIN I; MORELAND R.B. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. **J Androl.** 1999;6.:671–82.
92. VICARI P; FIGUEIREDO M.S. Priapismo na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** 2007;29:275–278.
93. WU L.C; SUN C.W; RYAN T.M; PAWLIK K.M; REN J; TOWNES T.M. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. **Blood.** 2006;108(4):1183–8.
94. XIA N; DAIBER A; FÖRSTERMANN U; LI H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. **Br J Pharmacol.** 2017;174(12):1633–46.
95. YAZIR Y; DEMIRTAŞ ŞAHIN T; FURAT RENÇBER S; GACAR G; HALBUTOĞULLARI Z. S; UTKAN, T; ARICIOGLU, F. Restorative effect of resveratrol on expression of endothelial and neuronal nitric oxide synthase in cavernous tissues of chronic unpredictable mild stress-exposed rats: an impact of inflammation. **Int J Impot Res.** 2018;(v;30(6):318–26).
96. YAZIR Y; UTKAN T; ŞAHIN T.D; GOCMEZ S.S. Improvement of penile neurogenic and endothelial relaxant responses by chronic administration of resveratrol in rabbits exposed to unpredictable chronic mild stress. **Int J Impot Res.** 2018; (4):163–70.
97. YIEE J.H; BASKIN L.S. Penile embryology and anatomy. **ScientificWorldJournal.** 2010;
98. YU W; WAN Z; QIU X.F; CHEN Y; DAI Y.T. Resveratrol, an activator of SIRT1, restores erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian J Androl.** 2013;Sep;15(5):646–51.

Anexo I: Parecer do comitê de ética no uso de animal em pesquisa da Universidade Estadual de Campinas



UNICAMP



CEUA/UNICAMP

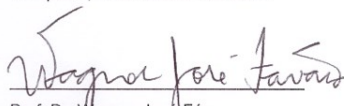
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Priapismo e disfunção miccional na anemia falciforme: fisiopatologia e novos candidatos a fármacos, registrada com o nº 4702-1/2017, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa e Fabio Henrique Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 27 de outubro de 2017.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/10/2017-01/10/2019
Vigência da autorização para manipulação animal:	27/10/2017-01/10/2019
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / Hbatm1(HBA)TowHbbtm2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtm3(HBG1,HBB)Tow/J
No. de animais:	90
Idade/Peso:	03 meses / 30g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / B6.129P2-Nos3tm1Unc/J
No. de animais:	120
Idade/Peso:	03 meses / 30g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia, HEMOCENTRO/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 27 de outubro de 2017.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente


 Fátima Alonso
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Avaliação farmacológica de um novo composto doador de óxido nítrico derivado do resveratrol para o tratamento do priapismo na anemia falciforme, registrada com o nº **5729-1/2021**, sob a responsabilidade de Prof. Dr. FABIO HENRIQUE DA SILVA e PAMELA DA SILVA PEREIRA, Fábio Henrique da Silva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de **18/03/2021**.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2021 a 01/03/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/03/2021 a 01/03/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129Hbatm1(HBA)TowHbbtm2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtm3(H
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129Hbatm1(HBA)TowHbbtm2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtm3(H
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129Hbatm1(HBA)TowHbbtm2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtm3(H
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129Hbatm1(HBA)TowHbbtm2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtm3(H
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / B6.129Hbatm1(HBA)TowHbbtm2(HBG1,HBB*)Tow/Hbbtm3(H
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos

CERTIFICADO CEUA nº 64/2021

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	14
Idade/Peso:	3.00 Meses / 30.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Biologia Molecular e Hemostasia, HEMOCENTRO/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **25 de março de 2021**.

 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 Presidente

 Rosângela dos Santos
 Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedir a atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referentes a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, de acordo com o link disponível no site. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido implicará que os novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **CÍNTIA BAÚ BETIM CAZARIN, VICE-COORDENADOR DA CEUA/UNICAMP**, em 25/03/2021, às 15:28 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 25/03/2021, às 15:16 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site: sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: **53CFC30D 2DC5450C AF0979FA 07A54BED**

