

MARIA SUELI DO AMARAL

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE NA MUSCULATURA  
LISA CAVERNOSA DE RATOS DE MEIA-IDADE  
COM HIPERTENSÃO ARTERIAL

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
BRAGANÇA PAULISTA/SP

2013

MARIA SUELI DO AMARAL

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE NA MUSCULATURA  
LISA CAVERNOSA DE RATOS DE MEIA-IDADE  
COM HIPERTENSÃO ARTERIAL

ORIENTADOR:  
PROF. DR. MÁRIO ANGELO CLAUDINO

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em  
Ciências da Saúde da Universidade  
São Francisco para obtenção do título  
de Mestre em Ciências da Saúde.

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO  
BRAGANÇA PAULISTA/SP

2013

WJ 709  
A515a

Amaral, Maria Sueli do.

Avaliação da reatividade na musculatura lisa cavernosa de ratos de meia-idade com hipertensão arterial / Maria Sueli do Amaral. -- Bragança Paulista, 2013.

xv, 33 p.

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

Orientação de: Mário Angelo Claudino.


1. Disfunção erétil. 2. Meia-idade. 3. Ratos.  
4. Hipertensão arterial. I. Claudino, Mário Angelo.  
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

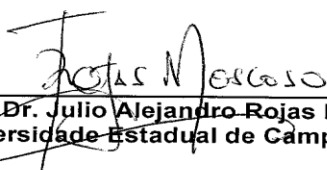
**AMARAL S., Maria**, “Avaliação da reatividade na musculatura lisa cavernosa de ratos de meia idade com hipertensão arterial”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e sete de Fevereiro de 2013 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



**Prof. Dr. Mário Angelo Claudino**  
Universidade São Francisco



**Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero**  
Universidade São Francisco



**Prof. Dr. Julio Alejandro Rojas Moscoso**  
Universidade Estadual de Campinas

*Dedicatória*

*A Deus por estar sempre presente na minha vida, guiando e protegendo meus passos.*

*A meus pais Jésus Ferreira do Amaral (in memoriam), e Jenny Maria do Amaral, grandes responsáveis pela minha formação, A vocês dedico e dedicarei todos minhas conquistas, sou eternamente grata pelo amor incondicional dedicado a mim.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente o meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr. Mário Angelo Claudino por sua orientação, paciência e por todo o crescimento profissional adquirido.

Agradeço a minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Fernanda Bruschi Marinho Priviero pelos ensinamentos e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho e por ter aceitado participar da banca examinadora.

Agradeço a Prof<sup>a</sup> Thalita Rocha pelos ensinamentos, admiro a competência, dedicação, humildade e generosidade.

Agradeço a Secretária de pós Graduação Stricto Sensu da Universidade São Francisco em especial as secretárias Vilma e Tatine.

Agradeço ao Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Prof<sup>o</sup> Dr. Edson Antunes e seu aluno Ms. Fabio Henrique da Silva pela grande contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Professor Dr. Julio Alejandro Rojas Moscoso por ter aceitado participar da banca examinadora e enriquecido este trabalho com suas considerações.

Ao meu grande amigo Rudson Antônio Ribeiro de Oliveira pela amizade e companhia diária, pelo respeito e ajuda indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha sobrinha Monica Amaral Maia por ter me incentivado a fazer o curso de mestrado.

Meus sinceros agradecimentos aos meus irmãos, irmãs e sobrinhos pelo apoio durante todo este período.

Ao Thiago Porfirio por toda contribuição para realização desse sonho.

Agradeço a José de Oliveira Caproni, aos Gestores do Hospital das Clinicas Samuel Libânio (João Batista Cunha; Luciana Gonçalves; Lidiane; Simone Pedroso) e a Secretária de Saúde da Cidade de Pouso Alegre, por terem me liberado do trabalho para adquirir novos conhecimentos no curso de mestrado.

Aos colegas e pacientes do Hospital das Clinicas Samuel Libânio e Unidade Básica de Saúde “Caic Arvore Grande” por terem compreendido a minha ausência e me incentivado a continuar meus estudos.

Aos amigos da Universidade São Francisco, Marta, Jussara, Antonio, Cíntia, Gilberto agradeço por toda a amizade, alegria e pela ajuda compartilhada no dia a dia de trabalho.

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

*Epigrafe*

*“O único lugar onde o sucesso vem  
antes do trabalho é no dicionário”*

*Albert Einstein*



## RESUMO

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana adequada para a satisfação sexual. A DE ocorre em graus variáveis e prejudica a qualidade de vida, particularmente o bem-estar pessoal e as inter-relações familiares e sociais. A DE constitui importante problema de saúde pública por sua alta prevalência em idosos e por estar associada a fatores de risco como a hipertensão arterial. Dessa forma, pesquisas que procurem entender a DE em sua fase inicial e suas relações com o processo de envelhecimento associado à hipertensão arterial podem repercutir positivamente não somente para o esclarecimento da fisiopatologia dessas desordens, como também para a melhora da terapêutica e qualidade de vida. Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar a fisiopatologia da DE decorrente do envelhecimento em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) de meia-idade (10 meses), procurando explorar as alterações das respostas relaxantes e contráteis do tecido erétil. Nossos resultados mostraram que os animais de meia-idade e hipertensos de meia-idade apresentaram uma redução da resposta nitrérgica induzida pela estimulação elétrica (EFS), do relaxamento dependente de endotélio mediado pela acetilcolina e do relaxamento independente de endotélio mediado pelo nitroprussiato de sódio. Além disso, os animais de meia-idade e hipertensos de meia-idade apresentaram um aumento significativo da resposta contrátil mediado pela fenilefrina e da contração neurogênica induzida pela EFS. Assim, concluímos que tanto os animais de meia-idade, quanto os animais hipertensos de meia-idade apresentam uma redução dos mecanismos de relaxamento e um aumento do mecanismo contrátil adrenérgico, sendo que os animais hipertensos de meia-idade apresentam também um aumento do mecanismo de contração neurogênica comprometendo a reatividade da musculatura lisa cavernosa e conseqüentemente favorecendo o desenvolvimento da disfunção erétil.

Palavras-chave: Disfunção Erétil; Meia-idade; Ratos; hipertensão Arterial;

## **ABSTRACT**

Erectile dysfunction (ED) is defined as the inability to achieve or maintain adequate penile erection for sexual satisfaction. ED occurs in different degrees and harms quality of life, particularly the personal welfare and inter-family and social relationships. DE is an important public health problem because of its high incidence in the elderly and it is associated with risk factors such as hypertension. Thus, studies that aim to understand the ED in its early stages and its relations with the aging process associated with hypertension may impact positively not only to clarify the pathophysiology of these disorders, but also to the improve therapy and quality of life. The objective of this study was to characterize the pathophysiology of ED associated with aging in spontaneously hypertensive rats (SHR) middle-aged (10 months), with the objective of explore the changes in contractile and relaxant responses of the erectile tissue. Our results showed that middle-aged animals and middle-aged hypertensive patients showed a reduction of nitrergic response induced by electrical stimulation (EFS) , endothelium-dependent relaxation mediated by acetylcholine and endothelium-independent relaxation mediated by sodium nitroprusside. Moreover, middle-aged animals and middle-aged hypertensive people experienced a significant increase in contractile response mediated by phenylephrine and EFS-induced neurogenic contraction. Thus, we conclude that both middle-aged animals, and hypertensive middle-aged animals present a reduction of the relaxation mechanisms and increased contractile adrenergic mechanism, and the hypertensive middle-aged animals show also an increase in neurogenic contraction affecting the cavernous smooth muscle reactivity and consequently favoring the development of erectile dysfunction.

Keywords: Erectile Dysfunction; Middle Age; Mice; Arterial hypertension;

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACh : acetilcolina

AR: receptores adrenérgicos

$\alpha$ -AR :  $\alpha$ -adrenoceptores

Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio de hidrato

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O: cloreto de cálcio dihidratado

CEMIB: Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica

CEP : Comitê de Ética e Pesquisa

DAG: diacilglicerol

DE : disfunção erétil

DNA: do inglês *deoxyribonucleic acid*

EC<sub>50</sub> : concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima;

ETs: endotelinas

EFS: estimulação elétrica de campo

E.P.M. erro padrão das médias

E<sub>max</sub>: resposta máxima produzida pelo agonista

eNOS : óxido nítrico sintase endotelial

ERO: espécies reativas de oxigênio

GCs : guanilil ciclase solúvel

GTP: guanosina trifosfato

GMPC: monofosfato cíclico de guanosina

ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva

IP3: inositol trifosfato

KCl : cloreto de potássio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato monopotássico (também dihidrogenofosfato de potássio, KDP, ou fosfato monobásico de potássio, MKP)

L-NAME: N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster

MgSO<sub>4</sub>7H<sub>2</sub>O : sulfato de magnésio

MLCK : quinase da cadeia leve de miosina

mM: milimolar

mN: milinewton  
NaCl : cloreto de sódio  
nM: nanomolar  
NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato de sódio  
NO : óxido nítrico  
NOS: óxido nítrico síntases  
nNOS: óxido nítrico síntase neuronal  
NANC: não adrenérgico não colinérgico  
O<sub>2</sub>: oxigênio  
CO<sub>2</sub>: gás Carbônico  
PE: fenilefrina  
PEC50: antilog da concentração de droga necessária para produzir 50% do efeito máximo  
PDE5: fosfodiesterase tipo 5  
PI3K: fosfatidil-inositol 3-kinase  
PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato  
PKG: proteína quinase G  
pO<sub>2</sub>: pressão de oxigênio  
ICP: pressão intracavernosa  
pH : antilog da concentração de íons de hidrogênio  
SHR: ratos espontaneamente hipertensos  
SNP: nitroprussiato de sódio  
WK: Wistar Kyoto  
Φ: é a resposta observada na ausência do agonista.  
μM: micromolar

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 01- Peso corporal e pressão arterial média dos grupos Wistar Kyoto (WK) jovem, WK de meia-idade e SHR de meia-idade.....</b>	<b>11</b>
--	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01- Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo SNP.....</b>	<b>12</b>
<b>FIGURA 02- Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela Acetilcolina.....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURA 03- Contração do corpo cavernoso de ratos induzida pela Fenilefrina.....</b>	<b>14</b>
<b>FIGURA 04- Relaxamento nitrérgico do corpo cavernoso de ratos induzido pela estimulação elétrica.....</b>	<b>15</b>
<b>FIGURA 05- Contração neurogênica do corpo cavernoso de ratos induzido pela estimulação elétrica.....</b>	<b>16</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fisiologia da ereção peniana.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Mecanismo fisiológico da ereção peniana.....	1
1.1.2. Mecanismos moleculares da contração e relaxamento do corpo cavernoso .....	2
1.1.2.1. Contração do corpo cavernoso e flacidez peniana.....	2
1.1.2.2. Relaxamento do corpo cavernoso e ereção peniana.....	3
1.1.3. Disfunção erétil associada às doenças cardiovasculares.....	4
1.1.4. Envelhecimento, hipertensão arterial e disfunção erétil.....	5
<b>2. OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1. Animais.....	7
3.2. Medida da pressão arterial média ( método in vivo) .....	7
3.3. Preparação da musculatura lisa cavernosa.....	7
3.4. Protocolos experimentais.....	9
3.5. Análise estatística.....	10
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>11</b>
4.1. Peso corporal e pressão arterial média.....	11
4.2. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzidos pelo SNP.....	12
4.3. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzidos pela Acetilcolina.....	13
4.4. Contração do corpo cavernoso de ratos induzidos pela Fenilefrina.....	14
4.5. Relaxamento nitrérgico do corpo cavernoso de ratos induzidos pela estimulação elétrica.....	15
4.6. Contração neurogênica do corpo cavernoso de ratos induzidos pela estimulação elétrica.....	16
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>23</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## *1.1. Fisiologia da ereção peniana*

### *1.1.1. Mecanismo fisiológico da ereção peniana*

Durante o estado flácido, as arteríolas e os sinusóides estão contraídos, devido principalmente, à ativação de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, exercendo resistência máxima ao influxo arterial. Neste estado, apenas pequena percentagem de sangue adentra os corpos cavernosos com propósitos nutricionais (Traish *et al.*, 1999). Ao mesmo tempo em que os sinusóides estão contraídos, as veias drenam livremente para veias extra-penianas. Neste estado, a musculatura lisa trabecular dos corpos cavernosos e das artérias cavernosas e helicinais se mantém em contração permanente. As trabéculas são drenadas pelas vênulas emissárias que se comunicam com as veias cavernosas. Neste estado flácido, a  $pO_2$  varia de 20 a 40 mm Hg no pênis (Kim *et al.*, 1993). Quando o bloqueio da atividade simpática se instala, essas musculaturas relaxam (tumescência), permitindo o influxo arterial e aumento progressivo da pressão sanguínea intracavernosa. Assim, a dilatação das artérias cavernosa e helicinal levam ao aumento do fluxo sanguíneo nos espaços lacunares, ao mesmo tempo em que o relaxamento do músculo liso trabecular dilata os espaços lacunares, causando expansão do pênis. O influxo de sangue arterial está associado a aumento na  $pO_2$  (90-100 mm Hg) durante o estado de tumescência (Kim *et al.*, 1993). A elevação da pressão sanguínea ao nível das artérias helicinais promove a expansão do músculo liso trabecular contra a túnica albugínea. Este evento comprime o plexo de vênulas sub-túnicas, reduzindo o efluxo venoso no espaço lacunar; dessa forma, o pênis é mantido rígido através do mecanismo de oclusão venosa (Krane *et al.*, 1989; Andersson & Wagner, 1995).



## ***1.1.2. Mecanismos moleculares de contração e relaxamento do corpo cavernoso***

### **1.1.2.1. Contração do corpo cavernoso e flacidez peniana**

O grau de contração do músculo liso do corpo cavernoso determina os estados funcionais de flacidez peniana, tumescência, ereção ou detumescência. O balanço entre fatores contráteis e relaxantes é controlado, por sua vez, por mecanismos centrais e periféricos (Andersson, 2001; Toda *et al.*, 2005). Nas diferentes manifestações da (DE) podem haver causas comuns nos diferentes passos envolvidos na neurotransmissão, propagação de impulsos e transdução intracelular de sinais provenientes de sinalização neuronal e do próprio músculo liso cavernoso. A noradrenalina, as endotelinas (ETs) e os prostanóides estão entre os vários transmissores e moduladores que contribuem para a contração do tecido erétil peniano (Gratzke *et al.*, 2010).

A neurotransmissão noradrenérgica (simpática) desempenha um papel essencial na regulação do tônus do músculo liso dos corpos cavernosos. Os vasos penianos e o músculo liso cavernoso recebem uma vasta inervação adrenérgica, que mantém o estado flácido, principalmente através da atividade tônica destes nervos, causando liberação maciça de noradrenalina. Uma vez liberada, a noradrenalina estimula  $\alpha$ -adrenoceptores ( $\alpha$ -AR), induzindo contração da vasculatura peniana e do músculo liso trabecular do corpo cavernoso (Dean & Lue, 2005).

Os mecanismos intracelulares decorrentes da atividade contrátil evocada pela ativação de  $\alpha$ -AR pela noradrenalina incluem a ativação da fosfolipase C, a qual cataliza a clivagem de fosfatidilinositol em inositol trisfosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), aumentando-se assim os níveis intracelulares de cálcio. Subsequentemente, o cálcio se liga à calmodulina, a qual ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), levando ao aumento expressivo de fosforilação da MLCK. Durante este processo, a MLCK fosforilada interage com a  $\alpha$ -actina resultando na contração do músculo liso (Berridge, 2008; Gratzke *et al.*, 2010). Várias evidências sugerem que no corpo cavernoso as respostas  $\alpha$ -adrenérgicas são parcialmente dependentes da proteína G monomérica RhoA e de seu alvo intracelular Rho-Kinase (Mills *et al.*, 2003; Texeira *et al.*, 2005; Jin & Burnett, 2006).

### 1.1.2.2. Relaxamento do corpo cavernoso e ereção peniana

O óxido nítrico (NO) é o principal neurotransmissor de um sistema de transdução de sinais que atua no pênis para mediar a resposta erétil (para revisão veja Toda *et al.*, 2005). As enzimas responsáveis pela formação do NO são conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS), encontradas nas fibras nitrérgicas (nNOS) e células endoteliais (eNOS). Essas enzimas catalisam o metabolismo da L-arginina, formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do produto intermediário N $\omega$ -hidroxi-L-arginina (Ignarro & Murad, 1995; Chatterjee *et al.*, 2008). No rato, camundongo e no homem, a nNOS está localizada no plexo pélvico, nervos cavernosos e seus terminais nervosos no tecido erétil, além de nervos penianos dorsais e plexos nervosos na adventícia de artérias cavernosa e dorsal (Leone *et al.*, 1994; Ehmke *et al.*, 1995; Hedlund *et al.*, 1999; Mizusawa *et al.*, 2001). Além disso, o endotélio também libera NO em resposta à acetilcolina (ACh) ou bradicinina no pênis (Saenz de Tejada *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 1998). A vasodilatação das artérias helicinas causada pela despolarização do nervo cavernoso leva à liberação de NO do endotélio sinusóide, como consequência do aumento do fluxo sanguíneo (Musicki *et al.*, 2004). Desta forma, a regulação da função erétil parece não ser mediada exclusivamente pelo NO oriundo de fibras nitrérgicas. O aumento da força de cisalhamento evocado durante a resposta erétil estimula a fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K), fosforilando a proteína quinase B que, por sua vez, fosforila a eNOS levando à geração do NO no endotélio. Assim, acredita-se que a enzima nNOS inicia a resposta erétil enquanto que a eNOS contribui para a manutenção do estado erétil (Hurt *et al.*, 2002; Burnett, 2004).

Diversos estudos conduzidos na década retrasada mostraram que inibidores da NOS têm a capacidade de bloquear o relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso induzido por estimulação elétrica das terminações não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC) em várias espécies como coelho, cão, cavalo, macaco, rato, camundongo e humano (Ignarro *et al.*, 1990; Leone *et al.*, 1994; Hayashida *et al.*, 1996; Recio *et al.*, 1998; Okamura *et al.*, 1998; Hedlund *et al.*, 1999). Após a estimulação elétrica do corpo cavernoso, observaram níveis elevados de nitritos, nitratos e citrulina no coelho e humanos (Ignarro *et al.*, 1990; Leone *et al.*, 1994). O NO, bem como doadores de NO, relaxam preparações de tecido erétil de humanos e coelhos, e causa tumescência em gatos e macacos (Rajfer *et al.*, 1992; Bush *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994; Hellstrom *et al.*, 1994). Sabe-se que, quando liberado de fibras nitrérgicas ou do endotélio, o NO

se difunde para células musculares lisas adjacentes e se liga ao seu receptor fisiológico intracelular, a guanilil ciclase solúvel (GCs). Esta ligação ocorre diretamente no grupo heme formando um complexo heme-ferrosnitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional que ativa a GCs (para revisão veja Lucas *et al.*, 2000; Priviero & Webb, 2010). A ativação desta enzima pelo NO leva à conversão de guanosina trifosfato (GTP) no segundo-mensageiro, monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A elevação de GMPc ativa proteína quinase dependente de GMPc (PKG), que conduz a redução da concentração de cálcio intracelular, causando o relaxamento da musculatura lisa e, conseqüentemente, ereção peniana. A resposta erétil é interrompida quando o GMPc é hidrolisado a GMP pela ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), cessando assim o processo de ereção peniana (Lucas *et al.*, 2000; Toda *et al.*, 2005).

### ***1.1.3. Disfunção erétil associada a doenças cardiovasculares***

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana adequada para a satisfação sexual (*National Institutes of Health Consensus Statement*, 1993). A disfunção erétil ocorre em graus variáveis e prejudica a qualidade de vida, particularmente o bem-estar pessoal e as inter-relações familiares e sociais (Johannes *et al.*, 2000). A etiologia da disfunção erétil é um processo multifatorial e pode ser de origem orgânica, neurogênica, ou ambas associadas. Na disfunção erétil orgânica, as causas mais comuns são de origem vasculogênica (Agarwal *et al.*, 2006). Pacientes que apresentam doença vascular estão predispostos a desenvolver disfunção erétil vasculogênica (Bortolotti *et al.*, 1997; Jeremy & Mikhailidis, 1998; Sullivan *et al.*, 1999). A insuficiência cardíaca congestiva (ICC), hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, doenças arteriais coronárias, tabagismo, envelhecimento e sedentarismo são considerados fatores de risco que atuam de maneira sinérgica no desenvolvimento da disfunção erétil vasculogênica (Bortolotti *et al.*, 1997; Jeremy & Mikhailidis, 1998; Sullivan *et al.*, 1999; Kloner, 2003; Fung *et al.*, 2004; Apostolo *et al.*, 2009).

#### ***1.1.4. Envelhecimento, Hipertensão Arterial e Disfunção Erétil (DE)***

O envelhecimento é conceituado como um processo complexo com múltiplas alterações nas estruturas fisiológicas e respostas funcionais do organismo (Jin & Burnett, 2006). O crescimento da população idosa é um fenômeno mundial e as projeções mais conservadoras indicam que em 2020 o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos, com um contingente superior a 30 milhões de pessoas (de Carvalho e Garcia, 2003). Com o aumento da expectativa de vida observou-se uma maior incidência e prevalência de certas doenças, particularmente as doenças do sistema cardiovascular (Veras, 2009; Naughton *et al.*, 2006). A taxa de mortalidade por doenças cardíacas e acidente vascular cerebral aumenta exponencialmente com o envelhecimento, respondendo por mais de 40% em pessoas com idades entre 65-74 anos e aproximadamente 60% com idade igual ou superior a 85 anos (Ungvari *et al.*, 2010). Além disso, estudos epidemiológicos têm mostrado que tanto o envelhecimento como a hipertensão arterial são fatores de risco para o desenvolvimento da DE (Johannes *et al.*, 2000).

A DE constitui importante problema de saúde pública por sua prevalência em idosos (Seftel *et al.*, 2003; Teles *et al.*, 2008) e por estar associada a fatores de risco como hipertensão arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, tabagismo e obesidade (Sullivan *et al.*, 1999; Jeremy *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2011). Evidências sugerem que a DE pode ser vista como uma doença vascular de manifestação precoce ou preditora de doenças cardiovasculares (Montague *et al.*, 2005). Recente estudo epidemiológico mostrou que a prevalência de DE aumenta progressivamente com o envelhecimento, sendo de 29%, 50% e 74% em homens com idades de 40 a 49 anos, 50 a 59 anos e 60 a 69 anos, respectivamente (Teles *et al.*, 2008). Acomete não somente idosos, mas também grande porcentagem de homens de meia-idade (Feldman *et al.*, 1994; Teles *et al.*, 2008). Além disso, aproximadamente 30% dos pacientes hipertensos possuem algum nível de disfunção erétil, que está diretamente relacionado à gravidade e ao período da hipertensão arterial (Burchardt *et al.*, 2000). Dessa forma, pesquisas que procurem entender a DE em sua fase inicial e suas relações com o processo de envelhecimento associado à hipertensão arterial podem repercutir positivamente não somente para o esclarecimento da fisiopatologia dessas desordens, como também para a melhora da terapêutica e qualidade de vida.

## 2. OBJETIVOS GERAIS

O presente projeto propôs caracterizar a fisiopatologia da disfunção erétil (DE) decorrente do envelhecimento em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) de meia-idade (10 meses), procurando explorar as alterações das respostas relaxantes e contráteis do tecido erétil. Para atingir tais metas, seguiremos as seguintes estratégias experimentais:

### **Delineamento experimental:**

- 2.1. Realização de curvas concentração-resposta *in vitro* aos agentes relaxantes, acetilcolina e ao doador de NO (nitroprussiato de sódio; SNP) em corpos cavernosos de ratos de meia-idade hipertensos;
- 2.2. Realização de curvas concentração-resposta *in vitro* ao agente contrátil, fenilefrina em corpos cavernosos de ratos de meia-idade hipertensos;
- 2.3. Avaliação do relaxamento nitrérgico e a contração neurogênica nos corpos cavernosos, realizando-se curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico (EFS) em corpos cavernosos de ratos de meia-idade hipertensos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### ***3.1. Animais***

Foram usados ratos machos da linhagem Wistar Kyoto e espontaneamente hipertensos (SHR). 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 Central da Universidade São Francisco/Bragança Paulista. Os protocolos experimentais encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco (protocolo nº 001.06.11).

#### ***3.2. Medida de pressão arterial média (método in vivo)***

As pressões dos animais foram determinadas após o período de 10 meses sendo consideradas como médias basais. Os ratos foram anestesiados com uretana (1,3 g/Kg). A carótida direita foi canulada para monitoração contínua da pressão arterial média através de transdutores de pressão (Grass, Astro-Med Industrial Park, U.S.A.).

#### ***3.3. Preparação da musculatura lisa cavernosa***

Os animais foram anestesiados com uretana (1,3 g/Kg). e, em seguida, exsanguinados por secção dos vasos cervicais. O pênis foi removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit gelada na seguinte composição (mM): NaCl, 130; NaHCO<sub>3</sub>, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.18; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.17 e CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 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 (10 ml) preenchidos com a solução Krebs-Henseleit, continuamente

aerado com O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (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 (5 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). A viabilidade dos tecidos foi verificada através da contração produzida pela adição ao banho de solução de Krebs modificada, em que 80 mM de NaCl foi substituído de forma equimolar por KCl. Somente aqueles tecidos que responderam ao KCl foram aproveitados e utilizados nos protocolos experimentais.

As respostas contráteis dos agonistas foram medidas em mN/mg de peso úmido do strip do corpo cavernoso. O logaritmo das concentrações molares dos agonistas foi colocado em abscissas e a resposta contrátil em mN/mg nas ordenadas. 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<sub>max</sub> é a máxima resposta que o agonista pode produzir, “c” é o logaritmo da EC<sub>50</sub>, 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<sub>max</sub>, log EC<sub>50</sub> e o “n” foram feitas utilizando-se o programa computacional GraphPad Prism, considerando o parâmetro Φ como zero.

### ***3.4. Protocolos experimentais***

#### Protocolos de contração

Foram realizadas curvas concentração-resposta cumulativa ao agonista  $\alpha$ -1 adrenérgico fenilefrina (1 nM-100  $\mu$ M) e curvas frequência-resposta (1-32 Hz) ao estímulo elétrico em tecidos previamente incubados L-Name (inibidor de NO sintase; 100  $\mu$ M) e atropina (antagonista muscarínico; 1  $\mu$ M).

#### Protocolos de relaxamento

Para analisar a resposta relaxante dos corpos cavernosos, foi realizada a pré-contração tecidual com fenilefrina (10  $\mu$ M). Após a estabilização da resposta contrátil (sem variações na tensão), foram construídas curvas concentração-resposta nos corpos cavernosos ao agonista muscarínico acetilcolina (1 nM - 1 mM) e ao doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (SNP; 1 nM - 1 mM). Foram determinadas a potência ( $pEC_{50}$ ) e a resposta máxima ( $E_{max}$ ) em todos os protocolos de curva concentração-resposta. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%.

#### Protocolos de relaxamento nitrérgico e contração neurogênica

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.

As respostas relaxantes à estimulação elétrica (EFS, 1-32 Hz) foram obtidas em tecidos previamente tratados com guanetidina (30  $\mu$ M) para depletar os estoques de noradrenalina, e atropina (1  $\mu$ M) para bloquear a resposta muscarínica. Em seguida, os tecidos foram pré-



contraídos com fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ) para construção da curva frequência-resposta (1-32 Hz). A resposta contrátil induzida pela estimulação elétrica foi avaliada em tecidos previamente tratados com L-NAME (100  $\mu\text{M}$ , inibidor não seletivo da NOS) e atropina (1  $\mu\text{M}$ , antagonista de receptor muscarínico).

### ***3.5. Análise estatística***

Valores experimentais de contração foram calculados em relação à contração máxima produzida pela PE (mM absoluto), e os valores de relaxamento em relação à contração máxima produzida pela fenilefrina (10  $\mu\text{M}$ ), os quais foram tomados como 100%. Valores de  $\text{EC}_{50}$  foram apresentados como o logaritmo negativo ( $\text{pEC}_{50}$ ) calculados pelo programa GraphPad Prism. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão das médias (E.P.M.) de  $n$  experimentos indicados em cada caso. Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Bonferroni*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. *Peso corporal e pressão arterial média*

A tabela 1 mostra que no início do protocolo experimental, não foram observadas alterações significativas no peso corporal dos grupos analisados. Entretanto, ao término do protocolo experimental os animais Wistar Kyoto jovem (3 meses) apresentaram um menor ganho ponderal ( $P < 0,05$ ) quando comparado aos animais de meia-idade (10 meses) Wistar Kyoto e SHR. Além disso, os animais SHR de meia-idade (10 meses) apresentaram um menor ganho de peso ( $P < 0,05$ ) quando comparados com os grupos Wistar Kyoto de meia-idade (Tabela 1).

A pressão arterial média foi avaliada apenas ao término do protocolo experimental através da inserção de uma cânula na artéria carótida. Nossos resultados mostram que os animais SHR de meia-idade apresentaram um aumento significativo da pressão arterial média ( $P < 0,05$ ) comparado aos grupos Wistar Kyoto jovem e de meia-idade (Tabela 1). Entretanto, não foram observadas alterações significativas na pressão arterial média dos animais Wistar Kyoto jovem e de meia-idade (Tabela 1).

**Tabela 1.** Peso corporal e pressão arterial média dos grupos Wistar Kyoto (WK) jovem, WK de meia- idade e SHR de meia-idade.

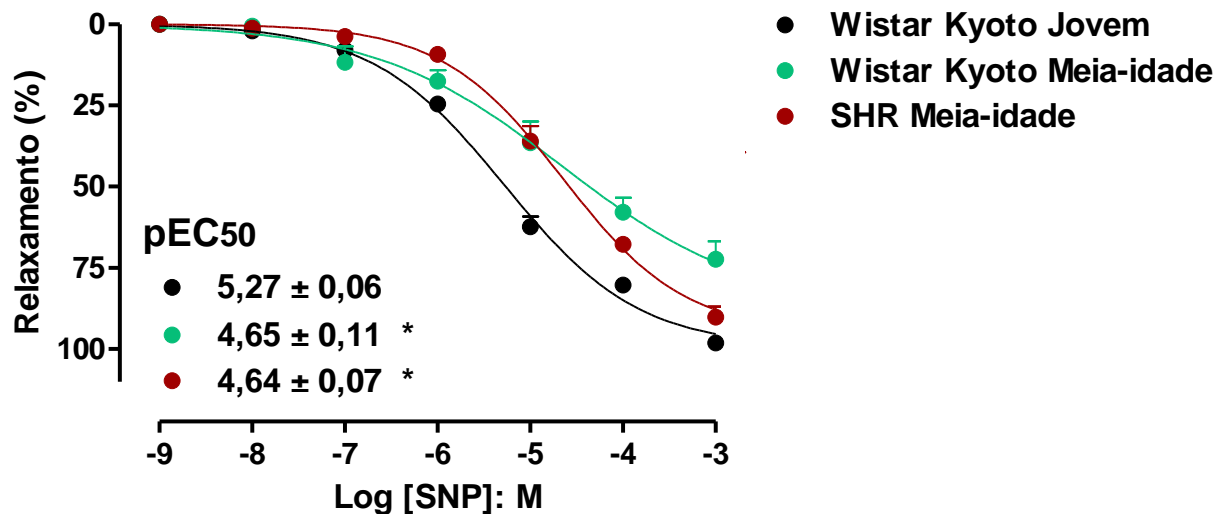
<i>Grupos</i>	Peso Corporal (mg)			Pressão Arterial Média (mmHg)
	Inicial	Final	$\Delta$ %	
<i>WK jovem</i>	204 $\pm$ 6	381 $\pm$ 2	87	83 $\pm$ 2
<i>WK meia- idade</i>	202 $\pm$ 5	533 $\pm$ 6*	163*	94 $\pm$ 4
<i>SHR meia-idade</i>	195 $\pm$ 4	425 $\pm$ 2* <sup>#</sup>	118* <sup>#</sup>	131 $\pm$ 5* <sup>#</sup>

Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média para 4-8 ratos.

\* $P < 0,05$  comparado ao grupo WK-J; <sup>#</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo WK-M.

#### 4.2. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pelo SNP

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP; 1 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10  $\mu$ M). A adição cumulativa do SNP promoveu um relaxamento dependente da concentração na musculatura lisa cavernosa. Após 10 meses de protocolo experimental a potência ( $pEC_{50}$ ) do SNP foi reduzida significativamente ( $P < 0,05$ ), tanto nos animais Wistar Kyoto meia-idade (WK;  $4,65 \pm 0,11$ ), como nos SHR ( $4,64 \pm 0,07$ ), quando comparado com o grupo WK jovem ( $5,27 \pm 0,06$ ; *Figura 01*). Além disso, a resposta máxima ao SNP foi alterada significativamente ( $P < 0,05$ ) apenas no grupo WK meia-idade ( $82 \pm 3\%$ ), quando comparado ao grupo WK jovem ( $98 \pm 2\%$ ). Os valores de resposta máxima do grupo SHR meia-idade ( $92 \pm 2\%$ ) não foram alterados significativamente quando comparados com os grupos analisados (*Figura 01*).

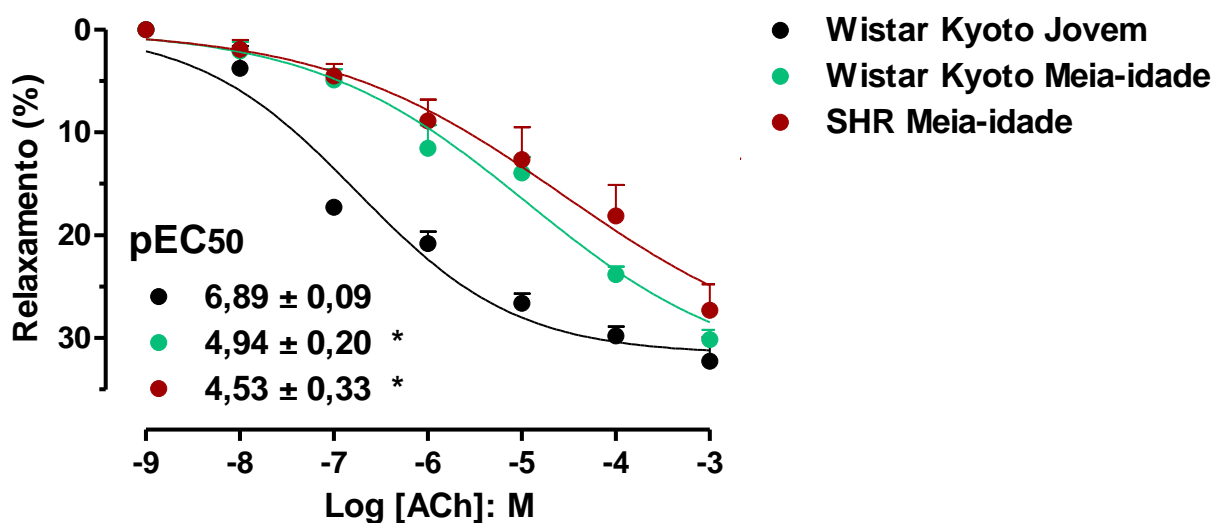


*Figura 01:* Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP; 1 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos Wistar Kyoto Jovens (12 sem), Wistar Kyoto de Meia-idade (42 sem) e SHR de Meia-idade (42 sem). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os valores de potência estão

inseridos no interior do gráfico. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 4-7 experimentos. \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo Wistar Kyoto Jovem.

#### 4.3. Relaxamento do corpo cavernoso de ratos induzido pela acetilcolina

O relaxamento dependente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito à acetilcolina (ACh; 1 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos pré-contráídos com fenilefrina (10  $\mu$ M). A adição cumulativa da ACh promoveu um relaxamento dependente da concentração na musculatura lisa cavernosa. Após 10 meses de protocolo experimental a  $pEC_{50}$  da ACh foi reduzida significativamente ( $P < 0,05$ ), tanto nos animais Wistar Kyoto (WK;  $4,94 \pm 0,20$ ), como nos SHR ( $4,53 \pm 0,33$ ), quando comparado com o grupo WK jovem ( $6,89 \pm 0,09$ ; *Figura 01*). Entretanto, a resposta máxima a ACh não foi alterada significativamente em nenhum dos grupos analisados (WK jovem:  $32 \pm 2\%$ , WK meia-idade:  $30 \pm 1\%$  e SHR meia-idade:  $28 \pm 2\%$ ; *Figura 02*).

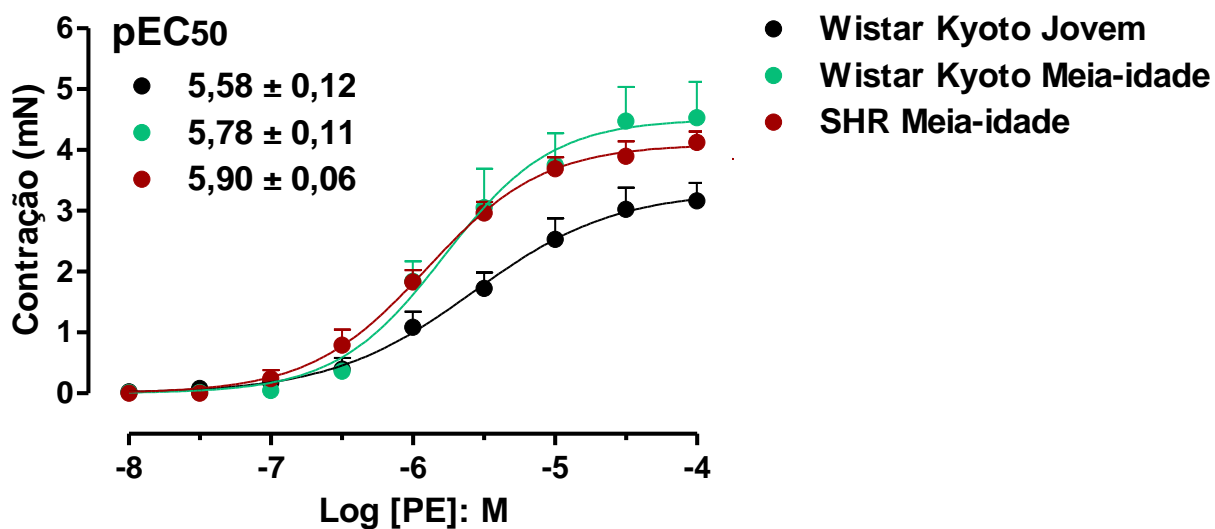


**Figura 02:** Curvas concentração-efeito a acetilcolina (ACh; 1 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos Wistar Kyoto Jovens (12 sem), Wistar Kyoto de Meia-idade (42 sem) e SHR de Meia-

idade (42 sem). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os valores de potência estão inseridos no interior do gráfico. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 4 experimentos. \*  $P < 0,05$  comparado ao grupo Wistar Kyoto Jovem.

#### 4.4. Contração de corpo cavernoso de ratos induzida pela fenilefrina

A resposta contrátil foi avaliada através da construção de curvas concentração-efeito à fenilefrina (PE; 10 nM – 100  $\mu$ M) em corpos cavernosos de ratos em tônus basal. A adição cumulativa da PE promoveu um efeito contrátil dependente da concentração na musculatura lisa cavernosa. Após 10 semanas de protocolo experimental  $pEC_{50}$  da PE não foi alterada significativamente em nenhum dos grupos analisados (WK jovem:  $5,58 \pm 0,12$ , WK meia-idade:  $5,78 \pm 0,11$ , SHR meia-idade:  $5,90 \pm 0,06$ ; *Figura 03*). Entretanto, a resposta máxima da PE foi significativamente aumentada após 10 semanas de protocolo experimental tanto no grupo WK meia-idade ( $4,54 \pm 0,58$  mN) como no grupo SHR meia-idade ( $4,13 \pm 0,18$  mN), quando comparado com o grupo WK jovem ( $3,17 \pm 0,25$  mN; *Figura 03*)

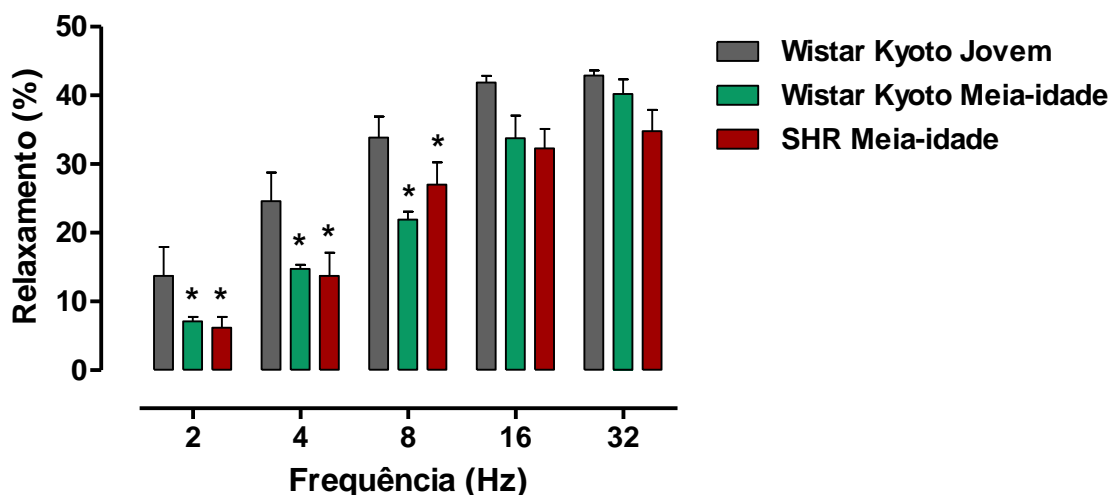


*Figura 03:* Curvas concentração-efeito a fenilefrina (PE; 10 nM – 100  $\mu$ M) em corpo cavernoso de ratos Wistar Kyoto Jovens (12 sem), Wistar Kyoto de Meia-idade (42 sem) e SHR

de Meia-idade (42 sem). A contração foi calculada como mN absoluto em tecido cavernoso mantendo o tônus basal. Os valores de potência estão inseridos no interior do gráfico. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 4-6 experimentos.

#### ***4.5. Relaxamento nitrérgico do corpo cavernoso de ratos induzido pela estimulação elétrica***

O relaxamento nitrérgico foi avaliado através da construção de curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico (EFS; 1-32 Hz), em corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina (10  $\mu$ M). A EFS promoveu um relaxamento dependente do aumento da frequência na musculatura lisa cavernosa e após 10 semanas de protocolo experimental os animais WK meia-idade e SHR meia-idade apresentaram uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do relaxamento nitrérgico nas menores frequências (2, 4 e 8 Hz), quando comparado com as respectivas frequências do grupo WK jovem (*Figura 04*). Além disso, não foram observadas alterações significativas no relaxamento nitrérgico entre os grupos de meia- idade (*Figura 04*).

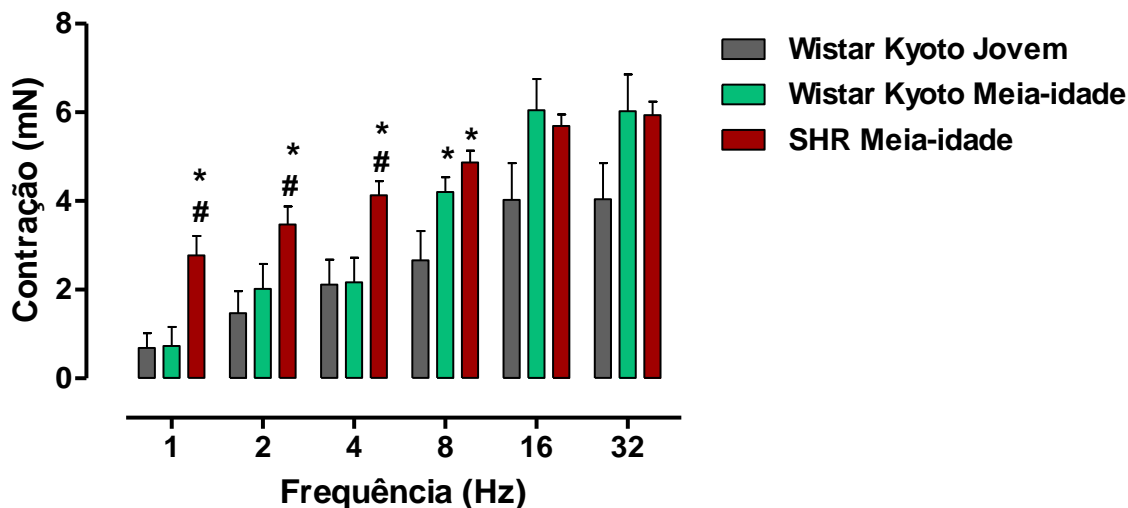


**Figura 04.** Curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico (EFS; 1-32 Hz) em corpo cavernoso de ratos Wistar Kyoto Jovens (12 sem), Wistar Kyoto de Meia-idade (42 sem) e SHR de Meia-idade (42 sem). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela

fenilefrina (10  $\mu$ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 4-7 experimentos. \*P<0,05 comparado com o grupo WK jovem.

#### 4.6. Contração neurogênica do corpo cavernoso de ratos induzido pela estimulação elétrica

A resposta neurogênica contrátil foi avaliada através da construção de curvas frequência-efeito ao estímulo elétrico (EFS; 1-32 Hz) em corpos cavernosos de ratos em tônus basal. O EFS promoveu uma resposta contrátil dependente do aumento da frequência na musculatura lisa cavernosa e após 10 semanas de protocolo experimental os animais SHR meia-idade apresentaram um aumento significativo (P<0,05) da resposta contrátil nas menores frequências (1, 2, 4 e 8 Hz), quando comparado com as respectivas frequências do grupo WK jovem e nas frequências de 1, 2 e 4 Hz, quando comparado com os animais WK meia-idade (*Figura 05*). Entretanto, os animais WK meia-idade não apresentaram alterações significativas quando comparado com o grupo WK jovem (*Figura 05*).



**Figura 05.** Curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico (EFS; 1-32 Hz) em corpo cavernoso de ratos Wistar Kyoto Jovens (12 sem), Wistar Kyoto de Meia-idade (42 sem) e SHR de Meia-idade (42 sem) em tônus basal. A contração foi calculada como contração máxima induzida pelo

EFS (mN). Os dados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 5-7 experimentos.  
\*P<0,05 comparado com o grupo Wistar Kyoto Jovem; #P<0,05 comparado com o grupo Wistar Kyoto Meia-idade.



## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos o efeito da associação de fatores de risco para a disfunção erétil (DE), como, envelhecimento e hipertensão arterial, caracterizando a fisiopatologia da DE decorrente do envelhecimento em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) de meia-idade (10 meses), explorando as alterações das respostas relaxantes e contráteis do tecido erétil. Sabe-se que o processo de envelhecimento, bem como, a hipertensão arterial acarreta alterações estruturais nos corpos cavernosos de humanos como aumento de colágeno, fibrose, redução da densidade volumétrica das células musculares lisas e endoteliais e redução do espessamento da túnica albugínea (Toblli *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2005; Ferrer *et al.*, 2009; Tomada *et al.*, 2010). Essas mudanças parecem contribuir para os danos vasculares, causando redução da função erétil (Jevtich *et al.*, 1990; Ferrer *et al.*, 2009; Tomada *et al.*, 2010). A deficiência de óxido nítrico (NO) tem sido apontada como uma das principais causas da disfunção erétil no envelhecimento (Muller *et al.*, 1991; Burnett 1997; Aranda *et al.*, 2004; Claudino *et al.*, 2009; Da Silva *et al.*, 2012). O NO é o principal neurotransmissor de um sistema de transdução de sinais que atua no pênis para mediar a resposta erétil (Lucas *et al.*, 2000; Anderson, 2003). Sabe-se que quando liberado de fibras nitrérgicas ou do endotélio, o NO se difunde para células musculares lisas adjacentes e se liga ao seu receptor fisiológico intracelular, a guanilil ciclase solúvel (GCs; Lucas *et al.*, 2000). A ativação desta enzima pelo NO leva à conversão de guanosina trifosfato (GTP) no segundo-mensageiro, monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A elevação dos níveis intracelulares de GMPc ativa proteínas quinases específicas, as quais fosforilam outras proteínas, ativam canais iônicos, e através destes eventos bioquímicos intermediários, levam à redução da concentração de cálcio intracelular, causando o relaxamento da musculatura lisa. O GMPc é hidrolisado a GMP pela ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), cessando assim a resposta erétil (Lucas *et al.*, 2000; Toda *et al.*, 2005). Desta forma, nesta primeira etapa do estudo avaliamos o relaxamento mediado pela via de sinalização do NO. Nossos resultados mostraram que os animais de meia-idade e hipertensos de meia-idade apresentaram uma redução do relaxamento nitrérgico mediado pelo ESF, do relaxamento independente de endotélio mediado pelo SNP e do relaxamento dependente de endotélio mediado pela ACh em corpos cavernosos de ratos. Esses resultados corroboram com estudos funcionais *in vitro* que mostraram redução do relaxamento

nitrérgico e do relaxamento dependente de endotélio em coelhos idosos de 20 meses (Angulo *et al.*, 2003), e de 36 a 48 meses (Numao *et al.*, 2007) e ratos de meia-idade com 10 meses (Silva *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos *in vivo* realizados com ratos idosos (19-22 meses) e ratos de meia-idade (10 meses) mostraram redução da pressão intracavernosa (Musicki *et al.*, 2005; Jin & Burnett, 2006; Silva *et al.*, 2013) e corpos cavernosos de animais idosos apresentaram redução da atividade e da expressão da enzima NOS (Musicki *et al.*, 2005; Bivalacqua *et al.*, 2007). Além disso, o relaxamento dependente de endotélio e o relaxamento nitrérgico estão diminuídos em corpo cavernoso de ratos hipertensos (Ushiyama *et al.*, 2004). Desta forma, nossos resultados mostram uma associação do envelhecimento e da hipertensão arterial com o desenvolvimento da DE, visto que as respostas mediadas pelo NO oriunda de fibras nitrérgicas e do endotélio sinusoidal apresentam-se reduzidas no corpo cavernoso de animais de meia-idade e hipertensos de meia-idade.

Entretanto, as alterações da reatividade da musculatura lisa cavernosa também podem estar associadas com o aumento do estresse oxidativo e consequente redução da biodisponibilidade de NO. O estresse oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas das complicações vasculares decorrentes do envelhecimento (Wei & Lee 2002), e na etiologia de doenças cardiovasculares como, hipertensão arterial, infarto do miocárdio, danos oriundos de isquemia e reperfusão, aterosclerose, diabetes mellitus e hiperlipidemia (Jeremy *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004, Li & Shah 2004; Hayashi *et al.*, 2005; Muzaffar *et al.*, 2005). O processo de envelhecimento e a hipertensão arterial provocam um desequilíbrio entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante do tecido (Wei & Lee 2002; Jeremy *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2004, Li & Shah 2004; Hayashi *et al.*, 2005; Muzaffar *et al.*, 2005). A produção excessiva de ERO leva a disfunções celulares, peroxidação lipídica e mutagenicidade do DNA, podendo causar danos celulares irreversíveis e morte celular (Sawyer *et al.*, 2002; Giordano *et al.*, 2005; Murdoch *et al.*, 2006; Takimoto & Kass 2007). Vários estudos mostram que a produção excessiva de ERO induz à disfunção endotelial em animais (Van der loo *et al.*, 2000; Csiszar *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2004; Ungvari *et al.*, 2007) e humanos idosos (Donato *et al.*, 2007; Jablonski *et al.*, 2007). Além disso, demonstrou-se que o aumento da produção de ERO está associado com a disfunção erétil em diferentes modelos patológicos como hipercolesterolemia e hipertensão arterial (Shunkla *et al.*, 2005; Jin, L. & Burnett, A. L., 2007). Além disso, estudos mostraram que o aumento de ERO reduz a biodisponibilidade de NO,

piorando a função endotelial e a atividade erétil (Keegan *et al.*, 1999; Burnett *et al.*, 2006). Portanto, pretendemos investigar através de análises bioquímicas e moleculares o papel das ERO na musculatura lisa cavernosa de ratos de meia-idade hipertensos para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nessas desordens, uma vez que, o trabalho precursor a esse estudo mostrou que a DE em ratos de meia idade com 10 semanas de idade está associada com a diminuição da biodisponibilidade de NO no tecido erétil devido a regulação positiva de subunidade gp91 (phox) da NADPH oxidase e a regulação negativa da nNOS/eNOS-p, assim, sugerindo que terapias antioxidantes podem ser uma boa abordagem farmacológica para prevenir DE em seus estágios iniciais (Silva *et al.*, 2013).

O óxido nítrico (NO) também é um importante modulador endógeno da contratilidade do músculo liso, sabe-se que a inibição da síntese de óxido nítrico promove um aumento das respostas contráteis em diferentes ensaios com musculatura lisa (Ignarro, 1989; Azadzi & Saenz de Tejada, 1991; Jeremy & Mikhailidis, 1998). O mecanismo de contração da musculatura lisa cavernosa ocorre através do aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que pode ocorrer através da abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L dependentes, permitindo a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para o sarcoplasma, ou através da ativação dos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (AR) acoplados a proteína G, induzindo a ativação da fosfolipase C que promove a conversão do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) em inositol trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG). A formação do  $\text{IP}_3$  leva a ativação dos receptores de  $\text{IP}_3$  e rianodina no retículo sarcoplasmático promovendo a liberação dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol. Ao ser liberado o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a proteína calmodulina formando o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, a qual ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK), levando ao aumento expressivo de fosforilação da MLCK. Durante este processo, a MLCK fosforilada interage com a  $\alpha$ -actina resultando na contração do músculo liso (Berridge, 2008; Gratzke *et al.*, 2010). Várias evidências sugerem que no corpo cavernoso as respostas  $\alpha$ -adrenérgicas são parcialmente dependentes da proteína G monomérica RhoA e de seu alvo intracelular Rho-Kinase (Mills *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2005; Jin & Burnett, 2006; Chalmers *et al.*, 2007; Rainbow *et al.*, 2009). Trabalhos têm demonstrado que tanto animais idosos como hipertensos apresentam um aumento do mecanismo de contração da musculatura lisa vascular e não vascular (Ferrer *et al.*, 2009; Tomada *et al.*, 2010), e um aumento da atividade da via de sinalização RhoA/Rho-Kinase (Jin *et al.*, 2006). Assim, nesta etapa do trabalho analisamos o mecanismo de contração adrenérgica e a contração neurogênica na

musculatura lisa cavernosa de ratos. Nossos resultados mostraram que os animais de meia-idade e hipertensos de meia-idade após 42 semanas apresentaram um aumento significativo da resposta contrátil mediada pela fenilefrina e da contração neurogênica mediada pelo EFS. Desta forma, sugerimos que o processo de envelhecimento e hipertensão arterial leva a um aumento do mecanismo contrátil na musculatura lisa cavernosa de ratos comprometendo a função erétil.

Apesar dos animais hipertensos de meia-idade terem apresentado uma redução significativa do relaxamento nitrérgico, dependente e independente do endotélio, bem como, um aumento significativo do mecanismo contrátil adrenérgico e neurogênico comprometendo a reatividade da musculatura lisa cavernosa, nossa avaliação prévia não detectou sinergismo na associação dos fatores de riscos, uma vez que, não foram observadas alterações significativas na reatividade da musculatura lisa cavernosa entre os grupos de animais hipertensos de meia-idade e dos animais de meia-idade. Assim, maiores estudos são necessários para o melhor entendimento dessas fisiopatologias no desenvolvimento da disfunção erétil.

## **6. CONCLUSÃO**

Desta forma, concluímos que tanto os animais de meia-idade, quanto os animais hipertensos de meia-idade apresentam uma redução dos mecanismos de relaxamento e um aumento do mecanismo contrátil adrenérgico, sendo que os animais hipertensos de meia-idade apresentam também um aumento do mecanismo de contração neurogênica comprometendo a reatividade da musculatura lisa cavernosa e conseqüentemente favorecendo o desenvolvimento da disfunção erétil.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, A.; Nandipati, K. C.; Sharma, R. K.; Zippe, C. D.; Raina, R. Role of oxidative stress in the pathophysiological mechanism of erectile dysfunction. *J Androl.*, 27(3):335-47, 2006.

Andersson, K. E. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. *J Urol.*, 170: S6-13, 2003.

Andersson, K. E.; Pharmacology of penile erection. *Pharmacol Rev*; **53** : 417–450, 2001.

Andersson, K. E.; Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol. Rev.*, 75: 191-236, 1995.

Ângulo, J.; Cuevas, P.; Fernández, A.; Gabancho, S.; Allona, A.; Martín-Morales, A.; Moncada, I.; Videla, S.; Sáenz de Tejada, I. Diabetes impairs endothelium-dependent relaxation of human penile vascular tissues mediated by NO and EDHF. *Biochem Biophys Res Commun*, 26;312(4):1202-8, 2003.

Apostolo, A.; Vignati, C.; Brusoni, D.; Cattadori, G.; Contini, M.; Veglia, F.; Magrì, D.; Palermo, P.; Tedesco, C.; Doria, E.; Fiorentini, C.; Montorsi, P.; Agostoni, P. Erectile dysfunction in heart failure: correlation with severity, exercise performance, comorbidities, and heart failure treatment. *J Sex Med*, 6(10):2795-805, 2009.

Aranda, P.; Ruilope, L. M.; Calvo, C.; Luque, M.; Coca, A.; Gil de Miguel, A. Erectile dysfunction in essential arterial hypertension and effects of sildenafil: results of a Spanish national study. *Am J Hypertens.*, 17(2):139-45, 2004.

Azadzoi, K. M.; Saenz De Tejada, I. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol.*, 146: 238-240, 1991.

Berridge, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* **1**; 586 (Pt 21): 5047-5061, 2008.

Bivalacqua, T. J.; Burnett, A. L.; Hellstrom, W. J.; Champion, H. C. Overexpression of arginase in the aged mouse penis impairs erectile function and decreases eNOS activity: influence of in vivo gene therapy of anti-arginase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(3):H1340-51, 2007.

Bortolotti, A.; Parazzini, F.; Colli, E.; Landoni, M. The epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors. *Int J Androl.*, 20: 323-334, 1997.

Burchardt, M.; Burchardt, T.; Baer, L.; Kiss, A. J.; Pawar, R. V.; Shabsigh, A.; de la Taille, A.; Hayek, O. R.; Shabsigh, R. Hypertension is associated with severe erectile dysfunction. *J Urol*, 164(4):1188-91, 2000.

Burnett, A. L.; Musicki, B.; Jin, L.; Bivalacqua, T. J. Nitric oxide/redox-based signalling as a therapeutic target for penile disorders. *Expert Opin Ther Targets*, 10(3):445-57, 2006.

Burnett, A. L. Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J Impot Res.*, 16: S15-9, 2004.

Burnett, J. C. Jr. Coronary endothelial function in health and disease. *Drugs.*, 53 Suppl 1:20-9, 1997.

Bush, P. A.; Aronson, W. J.; Buga, G.M.; Rajfer, J.; Ignarro, L.J. Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol.*;147(6):1650-5, 1992.

Chalmers, S.; Olson, M. L.; MacMILAN, D.; Ranbow, R. D.; McCarron, J. G. Ion channels in muscle.Regulations by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria.*Cell Calcium*, 42.447-466, 2007.

Chatterjee, A.; Black, S. M.; Catravas, J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol.* 49 (4-6): 134-140, 2008.

Claudino, M. A.; Franco-Penteado, C. F.; Priviero, F. B.; Camargo, E. A.; Teixeira, S. A.; Muscará, M. N.; De Nucci, G.; Zanesco, A.; Antunes, E. Upregulation of gp91phox subunit of

NAD(P)H oxidase contributes to erectile dysfunction caused by long-term nitric oxide inhibition in rats: reversion by regular physical training. *Urology*, 75(4):961-7, 2009.

Csiszar, A.; Ungvari, Z.; Edwards, J. G.; Kaminski, P.; Wolin, M. S.; Koller, A.; Kaley, G. Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function. *Circ Res.* 90 (11): 1159–1166, 2002.

Da Silva, F. H.; Claudino, M. A.; Báú, F. R.; Rojas-Moscoso, J. A.; Mónica, F. Z.; De Nucci, G.; Antunes, E. Vas deferens smooth muscle responses to the nitric oxide-independent soluble guanylate cyclase stimulator BAY 41-2272. *Eur J Pharmacol*, 5;688(1-3):49-55, 2012.

De Carvalho, J. A.; Garcia, R. A. The aging process in the Brazilian population: a demographic approach. *Cad Saude Publica.* 19(3):725-33, 2003.

Dean, R. C.; Lue, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. *Urol Clin North Am.*, (4):379-95, 2005.

Donato, A. J.; Eskurza, I.; Silver, A. E.; Levy, A. S.; Pierce, G. L.; Gates, P. E.; Seals, D. R. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res.* **100** (11): 1659–1666, 2007.

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.*, 7(3):147-156, 1995.

Feldman, H. A.; Goldstein, I.; Hatzichristou, D. G.; Krane, R. J.; McKinlay, J. B.; Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*, 151(1):54-61, 1994.



Ferrer, J. E.; Velez, J. D.; Herrera, A. M. Age-related morphological changes in smooth muscle and collagen content in human corpus cavernosum. *J Sex Med, Urology, Universidad CES, Medellin, Colombia.* 2009.

Fung, M. M.; Bettencourt, R.; Barrett-Connor, E. Heart disease risk factors predict erectile dysfunction 25 years later: the Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol.*, 43, 1405-11, 2004.

Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.*, **115**(3): 500-508, 2005.

Gratzke, C.; Angulo, J.; Chitale, K.; Dai, Y. T.; Kim, N. N.; Paick, J. S.; Simonsen, U.; Uckert, S.; Wespes, E.; Andersson, K. E.; Lue, T. F.; Stief, C. G. Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. *J Sex Med.* 7(1): 445-475, 2010.

Hayashi, T.; Juliet, P. A.; Kano-Hayashi, H.; Tsunekawa, T.; Dingqunfang, D.; Sumi, D.; Matsui-Hirai, H.; Fukatsu, A.; Iguchi, A. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. *Diabetes Obes Metab.*, 7(4):334-43, 2005.

Hayashida, H.; Okamura, T.; Tomoyoshi, T.; Toda, N. Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum. *J Urol*, 155: 1122-1127, 1996.

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.*, 127: 349-60, 1999.

Hellstrom, W. J.; Monga, M.; Wang, R.; Domer, F. R.; Kadowitz, P. J.; Roberts, J. A. Penile erection in the primate: induction with nitric oxide donors. ***J Urol.*** 151: 1723-1727. 1994.

Hurt, K. J.; Musicki, B.; Palese, M. A.; Crone, J. K.; Becker, R. E.; Moriarity, J. L.; Snyder, S. H.; Burnett, A. L. Akt dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 4061-4066, 2002.

Ignarro, L. J. Biological actions and properties of endothelium derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res*, 65, 1-21, 1989.

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.*, 170: 843-850, 1990.

Ignarro, L.; Murad, F. Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications. *Advances in Pharmacology.*, 34: 1-516, 1995.

Ishida, A.; Shigeri, Y.; Taniguchi, T.; Kameshita, I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther*, 100(3):291-305, 2003

Jablonski, K. L.; Seals, D. R.; Eskurza, I.; Monahan, K. D.; Donato, A. J. High-dose ascorbic acid infusion abolishes chronic vasoconstriction and restores resting leg blood flow in healthy older men. *J Appl Physiol*. 103: 1715–1721, 2007.

Jeremy, J. Y.; Jones, R. A.; Koupparis, A.J.; Hotston, M.; Persad, R.; Angelini, G. D.; Shukla, N. Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. *Int J Impot Res*, 19(3):265-80, 2007.

Jeremy, J. Y.; Mikhailidis, D. P. Cigarette smoking and erectile dysfunction. *J R Soc Health.*, 118: 151-155, 1998.

Jeremy, J. Y.; Yim, A. P.; Wan, S.; Angelini, G. D. Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease. *J Card Surg.*, 17(4):324-7, 2002.

Jevtich, M. J.; Khawand, N. Y.; Vidic, B. Clinical significance of ultrastructural findings in the corpora cavernosa of normal and impotent men. *J Urol*, 143(2):289-93, 1990.

Jiang, F.; Drummond, G. R.; Dusting, G. J. Suppression of oxidative stress in the endothelium and vascular wall. *Endothelium.*, 11(2):79-88, 2004.

Jiang, R.; Chen, J. H.; Jin, J.; Shen, W.; Li, Q. M. Ultrastructural comparison of penile cavernous tissue between hypertensive and normotensive rats. *Int J Impot Res.*, 17(5):417-23, 2005.

Jin, L.; Burnett, A. L. RhoA/Rho-kinase in erectile tissue: mechanisms of disease and therapeutic insights. *Clin Sci (Lond)*. 110: 153-165, 2006.

Jin, L.; Burnett, A. L. NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile Dysfunction. *Asian Journal of Andrology*, 10(1), 2007.

Johannes, C. B.; Araujo, A. B.; Feldman, H. A.; Derby, C. A.; Kleinman, K. P.; McKinlay, J. B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Urol.*, 163(2):460-3, 2000.

Keegan, A.; Cotter, M. A.; Cameron, N. E. Effects of diabetes and treatment with the antioxidant alpha-lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. *Diabetologia.*, 42(3):343-50, 1999.

Kim, N.; Vardi, Y.; Padma-Nathan, H.; Daley, J.; Golstein, I.; Saenz De Tejada, I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway: physiological role in penile erection. *J Clin Invest.*, 91: 437-442, 1993.

Kloner, R. A. Erectile dysfunction in the cardiac patient. *Curr Urol Rep*; 4(6):466-71, 2003.

Krane, R. J.; Goldstein, I.; Saenz de Tejada, I. Impotence. *N Engl J Med.*, (24):1648-59, 1989.

Leone, A. M.; Wiklund, N. P.; Hokfelt, T.; Brundin, L.; Moncada, S. Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract. *Neuroreport* 5: 733-736, 1994.

Li, J. M.; Shah, A. M. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 287(5):R1014-30. 2004.

- Lucas, K. A.; Pitari, G. M.; Kazerounian, S.; Ruiz-Stewart, I.; Park, J.; Schulz, S.; Chepenik, K. P.; Waldman, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.*, **52**: 375-414, 2000.
- Mills, T. M.; Lewis, R. W.; Wingard, C. J.; Linder, A. E.; Jin, L.; Webb, R. C. Vasoconstriction, RhoA/Rho-kinase and the erectile response. *Int J Impot Res.***5**: S20-24, 2003.
- Mizusawa, H.; Hedlund, P.; Hakansson, A.; Alm, P.; Andersson, K. E. Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br J Pharmacol.*, **132**(6): 1333-41, 2001.
- Montague, D. K.; Jarow, J. P.; Broderick, G. A.; Dmochowski, R. R.; Heaton, J. P.; Lue, T. F.; Milbank, A. J.; Nehra, A.; Sharlip, I. D. Erectile dysfunction guideline update panel, chapter 1: the management of erectile dysfunction. *J Urol*; **174**: 230-239, 2005.
- Muller, S. C.; El-Damanhoury, H.; Ruth, J.; Lue, T. F. Hypertension and impotence. *Eur Urol.*, **19**: 29-34, 1991.
- Murdoch, C. E.; Zhang, M.; Cave, A. C.; Shah, A. M. NADPH oxidase dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.*, **71**(2):208-215, 2006.
- Musicki, B.; Palese, M. A.; Crone, J. K.; Burnett, A. L. Phosphorylated endothelial nitric oxide synthase mediates vascular endothelial growth factor-induced penile erection. *Biol Reprod.*, **70**(2):282-9, 2004.
- Musicki, B.; Kramer, M. F.; Becker, R. E.; Burnett, A. L. Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis. *J Sex Med*; **2**(3):347-55; discussion 355-7, 2005.
- Muzaffar, S.; Shukla, N.; Jeremy, J. Y. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase: a promiscuous therapeutic target for cardiovascular drugs? *Trends Cardiovasc Med.*, **15**(8):278-82, 2005.

Naughton, C.; Bennett, K.; Feely, J. of chronic disease in the elderly based on a national pharmacy claims database. PMID:17047009, PubMed - indexed for MEDLINE. Age Ageing. 35(6):633-6. 2006.

NIH Consensus Development Panel on Impotence. Impotence, *Jama*; 270: 83-90, 1993.

Numao, N.; Masuda, H.; Sakai, Y.; Okada, Y.; Kihara, K.; Azuma, H. Roles of attenuated neuronal nitric-oxide synthase protein expression and accelerated arginase activity in impairing neurogenic relaxation of corpus cavernosum in aged rabbits. *BJU Int.* 99(6):1495-9, 2007.

Okamura, T.; Ayajiki, K.; Toda, N. Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves. *Am J Physiol*, 274: H1075-H1081, 1998.

Priviero, F. B.; Webb, R. C. Heme-dependent and independent soluble guanylate cyclase activators and vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 56: 229-233, 2010.

Rainbow, R. D.; Norman, R. I.; Everitt, D. E.; Brignell, J. L.; Davies, N. W.; Standen, N. B. Endothelin-I and angiotensin II inhibit arterial voltage-gated K<sup>+</sup> channels through different protein kinase C isoenzymes. *Cardiovasc Res*, 83(3):493-500, 2009.

Rajfer, J.; Aronson, W. J.; Bush, P. A.; Dorey, F. J.; Ignarro, L. J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *Engl J Med*, 326(2):90-4, 1992.

Recio, P.; López, P. G.; Hernández, M.; Prieto, D.; Contreras, J.; García-Sacristán, A. Nitrgic relaxation of the horse corpus cavernosum. Role of cGMP. *Eur J Pharmacol*, 351(1):85-94, 1998.

Saenz De Tejada, I.; Goldstein, I.; Krane, R. J. Local control of penile erection: nerves, smooth muscle and endothelium. In: Krane RJ (ed.), *Impotence*. Urol Clin North Amer Philadelphia: WB Saunders Co., 15: 9-15, 1988.

Sawyer, D. B.; Siwik, D. A.; Xiao, L.; Pimentel, D. R.; Singh, K.; Colucci, W. S. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.*, 34: 379-388, 2002.

Seftel, A. D. Erectile dysfunction in the elderly: epidemiology, etiology and approaches to treatment. *J Urol.*169(6):1999-2007. 2003.

Shukla, N.; Jones, R.; Persad, R.; Angelini, G. D.; Jeremy, J. Y. 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.* 517(3):224-31, 2005.

Silva FH, Mónica FZ, Báú FR, Brugnerotto AF, Priviero FB, Toque HA, Antunes E. Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase Plays a Major Role in Erectile Dysfunction in Middle-Aged Rats: Prevention by Antioxidant Therapy. *J Sex Med.* [Epub ahead of print].

Sullivan, M. E.; Thompson, C. S.; Dashwood, M. R.; Khan, M. A.; Jeremy, J. Y.; Morgan, R. J.; Mikhailidis, D. P. Nitric oxide and penile erection: is erectile dysfunction another manifestation of vascular disease? *Cardiovasc. Res.*, 43: 658-665, 1999.

Sun, D.; Huang, A.; Yan, E. H.; Wu, Z.; Yan, C.; Kaminski, P. M.; Oury, T. D.; Wolin, M. S.; Kaley, G. Reduced release of nitric oxide to shear stress in mesenteric arteries of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286: H2249–H2256, 2004.

Takimoto, E.; Kass, D. A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 49: 241-248, 2007.

Teixeira, C. E.; Bento, A. C.; Lopes-Martins, R. A.; Teixeira, S. A.; Von Eickstedt, V.; Muscara, M. N.; Arantes, E. C.; Giglio, J. R.; Antunes, E.; De Nucci, G. Effect of Tityus serrulatus scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrergic nerve fibres. *Br J Pharmacol.*, 123(3): 435-42, 1998.

Teixeira, C. E.; Ying, Z.; Webb, R. C. Proerectile effects of the Rho-kinase inhibitor (S)-(+)-2-methyl-1-[(4-methyl-5-isoquinoliny)sulfonyl]homopiperazine (H-1152) in the rat penis. *J Pharmacol Exp Ther.*, 315(1): 155-62, 2005.

Teles, A. G.; Carreira, M.; Alarcão, V.; Sociol, D.; Aragüés, J. M.; Lopes, L.; Mascarenhas, M.; Costa, J. G. Prevalence, severity, and risk factors for erectile dysfunction in a representative sample of 3,548 portuguese men aged 40 to 69 years attending primary healthcare centers: results of the Portuguese erectile dysfunction study. *J Sex Med*, 5(6):1317-24, 2008.

Toda, N.; Ayajiki, K.; Okamura, T. Nitric oxide and penile erectile function. *Pharmacol Ther.*, 106(2): 233-66, 2005.

Toblli, J. E.; Stella, I.; Inserra, F.; Ferder, L.; Zeller, F.; Mazza, O. N. Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 13 (1): 686-92, 2000.

Tomada, N.; Tomada, I.; Cruz, F.; Vendeira, P.; Neves, D. Characterization of VEGF and angiopoietins expression in human corpus cavernosum during aging. *J Sex Med*, 7( 1):1410-8, 2010.

Tomada, N.; Tomada, I.; Vendeira, P.; Neves, D. Expression of vascular endothelial growth factor and angiopoietins in human corpus cavernosum. *BJU Int*, 105(2):269-73, 2010.

Traish, A. M.; Kim, N. N.; Goldstein, I.; Moreland, R. B. Alpha-adrenergic receptors in the penis: identification, characterization, and physiological function. *J Androl*, 20(6): 671-82, 1999.

Ungvari, Z.; Kaley, G.; de Cabo, R.; Sonntag, N. Ó. S.; Csiszar, A. Mecanismos de envelhecimento vascular: novas perspectivas. *J Gerontol Um Biol Sci Med Sci.* 65 (10) :1028-41, 2010.

Ungvari, Z.; Orosz, Z.; Labinskyy, N.; Rivera, A.; Xiangmin, Z.; Smith, K.; Csiszar, A. Increased mitochondria H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production promotes endothelial NF-κB activation in aged rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: H37–H47, 2007.

Ushiyama, M.; Morita, T.; Kuramochi, T.; Yagi, S.; Katayama, S.; Erectile dysfunctions in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide hypertens *Res*,27 (4);253-61, 2004.

Van Der Loo, B.; Labugger, R.; Skepper, J. N.; Bachschmid, M.; Kilo, J.; Powell, J. M.; Palacios-Callender, M.; Erusalimsky, J. D.; Quaschnig, T.; Malinski, T.; Gygi, D.; Ullrich, V.; Lüscher, T. F. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med.* 192: 1731–1744, 2000.

Veras, R. Population aging today: demands, challenges and innovations. *Rev Saude Publica.* 43(3):548-54. 2009.

Wang, R.; Domer, F. R.; Sikka, S. C.; Kadowitz, P. J.; Hellstrom, W. J. Nitric oxide mediates penile erection in cats. *J Urol*, 151: 234-237, 1994.

Wei, Y. H.; Lee, H. C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med.* 227(9):671-82, 2002.

Wu, Y.; Zhang, L.; Yuan, X.; Wu, Y.; Yi, D. Quantifying links between stroke and risk factors: a study on individual health risk appraisal of stroke in a community of Chongqing. *Neurol Sci*, 32(2):211-9, 2011.