

FREDERICO JOSÉ REIS VEIGA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ERÉTIL EM RATOS COM
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: MODELO DE FÍSTULA
AORTOCAVAL

BRAGANÇA PAULISTA

2015

FREDERICO JOSÉ REIS VEIGA

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ERÉTIL EM RATOS COM
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: MODELO DE FÍSTULA
AORTOCAVAL

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.

BRAGANÇA PAULISTA

2015

WJ 709 Veiga, Frederico José Reis.
V528a Avaliação da função erétil em ratos com
insuficiência cardíaca: modelo de fístula aortocaval /
Frederico José Reis Veiga. -- Bragança Paulista,
2015.
55 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. Insuficiência cardíaca.
3. Óxido nítrico. 4. Musculatura lisa cavernosa.
I. Claudino, Mário Angelo. II. Título.

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

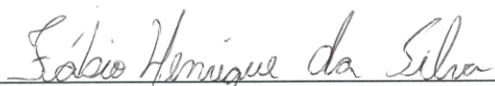
VEIGA, J. R., Frederico. "Avaliação da função erétil em ratos com insuficiência cardíaca: modelo de fístula aortocaval". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e nove de janeiro de dois mil e quinze pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Mario Ângelo Claudino
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Fábio Henrique da Silva
Universidade Estadual de Campinas

Dedicatória

A Deus e ao Todo, pela honra e graça da existência. A minha mulher Ângela, pela presença, apoio e incentivo durante todo o caminho. Aos meus filhos Bruno e Beatriz, pela compreensão e força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador, Prof. Dr. Mário Angelo Claudino por me possibilitar a oportunidade de crescimento pessoal e profissional, por sua dedicação, generosidade e orientação.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Alessandra Gambero e suas alunas, em especial M.^a Caroline Oliveira de Oliveira e M.^a Cíntia Rabelo e Paiva Caria pelos ensinamentos e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos companheiros do grupo de iniciação científica Sabrina Payne Tartarotti, Aline Moras, Silas Ramos Furquim, Rodrigo S. Heck, Luigi Annicchino, Guilherme Oliveira.

Agradeço a Secretaria de Pós Graduação Stricto Sensu da Universidade São Francisco, especialmente Vilma e Tatine, pela paciência e solicitude.

Agradeço ao Departamento de Farmacologia da UNICAMP, Prof. Dr. Edson Antunes e seus alunos Dr. Fabio Henrique da Silva e M.e Celso Saragossa pela participação no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a minha amada mulher Ângela, única responsável por esta conquista, sem seu apoio, compreensão e incentivo não teria ingressado nem concluído o programa.

Agradeço aos meus queridos filhos, Bruno e Beatriz, por compreenderem as ausências do papai e por serem luz e força em minha vida.

Agradeço a minha mãe Marlene pelo apoio e incentivo, a meu pai José Gileno, a meus irmãos Roberta, Giuliana e Hugo pela presença.

Agradeço aos meus avós Lourdinha e Arnaud, Valda e Francisco pelo exemplo e inspiração.

Agradeço aos animais que utilizei ao longo deste trabalho, que fique meu pedido de perdão.

Agradeço a Deus e ao Todo pela constante e direta participação em minha vida neste momento único da existência.

Agradeço aos companheiros nesse processo evolutivo. O importante não é o resultado final e sim como passei pelo caminho, a este, meu agradecimento.

RESUMO

A disfunção erétil (DE) é caracterizada como a incapacidade de se obter ou manter uma ereção peniana adequada à atividade sexual satisfatória. Trabalhos têm demonstrado uma forte associação de insuficiência cardíaca (IC) com o desenvolvimento da DE. Estudos epidemiológicos demonstraram que 85% dos pacientes com IC relataram algum episódio de DE. Sendo que, aproximadamente 75% destes pacientes relataram comprometimento da libido e 30% apresentam ausência completa de atividades sexuais. Evidências mostram que a IC e DE apresentam fatores de riscos semelhantes como, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. Esses fatores de riscos estão associados à disfunção do sistema nervoso autônomo e alterações em importantes vias de sinalização. Desta forma, usando o modelo de fístula aortocaval (FAV), caracterizamos a disfunção erétil decorrente da insuficiência cardíaca, procurando explorar as alterações funcionais das respostas relaxantes e contráteis do tecido erétil. Nossos resultados mostraram que após 4 semanas os animais com IC não apresentaram alterações na pressão arterial média ao ser comparado com o grupo controle. Entretanto, a análise de parâmetros cardíacos mostrou que os animais com IC apresentaram um aumento de aproximadamente 49% da massa cardíaca total e de aproximadamente 45% da massa do ventrículo esquerdo isolado. Ao avaliarmos a função erétil (in vivo), os animais com IC apresentaram uma redução significativa da pressão intracavernosa quando comparado ao grupo controle. As análises in vitro mostraram que, tanto a resposta relaxante dependente de endotélio, induzida pela ACh, como o relaxamento-independente de endotélio, induzido pelo SNP, não foram alterados em nenhum dos grupos analisados. Entretanto, os animais IC apresentaram uma redução significativa do relaxamento nitrérgico. Além disso, tanto a contração induzida pela fenilefrina como a contração neurogênica induzida pelo EFS foram aumentadas no corpo cavernoso de ratos com IC. A expressão proteica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e fosfodiesterase 5 (PDE5) foram significativamente reduzidas no tecido cavernoso dos animais com IC. Portanto, concluímos que o aumento do mecanismo contrátil associado à redução do mecanismo de relaxamento contribuiu para o desequilíbrio no controle do

tônis muscular cavernoso, bem como sua manutenção, e conseqüentemente, favorece o desenvolvimento da disfunção erétil associado à IC.

Palavras-chave: Disfunção Erétil, Insuficiência Cardíaca, Óxido Nítrico, Musculatura Lisa Cavernosa.

ABSTRACT

Erectile dysfunction (ED) is characterized as the inability to achieve or maintain a penile erection adequate for satisfactory sexual activity. Studies have shown a strong association of chronic heart failure (CHF) with the development of ED. Epidemiological studies has shown that 85% of CHF patients reported an episode of ED. Since approximately 75% of these patients reported impaired libido and 30% has complete absence of sexual activity. Although the high rates of ED in CHF patients, there are no experimental or human studies to evaluating the mechanisms responsible for urogenital dysfunctions. Evidence shows that CHF and ED have similar risk factors such as diabetes mellitus and cardiovascular disease. These risk factors are associated with dysfunction of the autonomic nervous system and changes in important signaling pathways. Thus, using the aortocaval fistula (FAV) model, we feature the erectile dysfunction caused by CHF, exploring the functional changes of the contractile and relaxation-responses in the erectile tissue. Our results showed that after 4 weeks, the CHF animals showed no changes in mean blood pressure when compared to the control group. However, analysis of cardiac parameters showed that, CHF animals increase in approximately 49% of the total heart weight and about 45% of isolated left ventricle weight. To evaluate erectile function (*in vivo*), CHF animals showed a significant reduction in the intracavernous pressure (ICP) when compared to the control group. In addition, *in vitro* assays shown that both endothelium-dependent relaxant response induced by ACh and endothelium-independent relaxant response induced by sodium nitroprusside (SNP) are not changed in any of the groups. However, CHF animals showed a significant reduction in the nitrenergic relaxation. Furthermore, both the contraction induced by phenylephrine and neurogenic contractions induced by EFS were increased in the corpora cavernosal of CHF rats. Protein expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and phosphodiesterase 5 (PDE5) were significantly reduced in the cavernous tissue of CHF animals. Therefore, we conclude that the increase of contractile mechanism associated with the impaired of the relaxation mechanism contributes to the imbalance in the cavernous muscle tone control, and consequently may induce the development of

erectile dysfunction in CHF rats.

Keywords: Erectile Dysfunction, Heart Failure, Nitric Oxide, Cavernous Smooth Muscle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh: acetilcolina

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina

α -AR: α -adrenoceptores

DAG: diacilglicerol

DE: disfunção erétil

EC₅₀: concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima

EFS: estimulação elétrica de campo

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

FAV: fístula aortocaval

GCs: guanilil ciclase solúvel

GTP: guanosina trifosfato

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva

IP3: inositol trifosfato

KCl: cloreto de potássio

KH₂PO₄: fosfato monopotássico

MAP: pressão arterial média

MgSO₄7H₂O: sulfato de magnésio

MLCK: quinase da cadeia leve de miosina

mN: milinewton

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

PE: fenilefrina

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

PDE5: fosfodiesterase tipo 5

PI3K: fosfatidil-inositol 3-kinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKG: proteína quinase G

pO₂: pressão de oxigênio

ICP: pressão intracavernosa

SNP: nitroprussiato de sódio

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1:</i> Peso corporal, pressão arterial média, massa cardíaca total e massa do ventrículo esquerdo isolado de animais SHAM e IC após 4 semanas do processo de indução da fistula aortocaval.....	33
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Medida da pressão intracavernosa.....	34
Figura 2: Curvas concentração-efeito à acetilcolina.....	35
Figura 3: Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio.....	36
Figura 4: Relaxamento induzido por estímulo elétrico	37
Figura 5: Curvas concentração-efeito à fenilefrina	38
Figura 6: Contração induzido por estímulo elétrico.....	39
Figura 7: Expressão proteica de eNOS	40
Figura 8: Expressão proteica de nNOS	41
Figura 9: Expressão proteica PDE5.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Anatomia peniana.....	18
1.2. Hemodinâmica da ereção peniana.....	19
1.2.1. Suprimento arterial.....	19
1.2.2. Drenagem venosa.....	20
1.2.3. Sistema sinusoidal.....	20
1.3. Fisiologia da ereção peniana.....	21
1.4. Mecanismos moleculares de contração e relaxamento do corpo cavernoso.....	21
1.4.1. Contração do corpo cavernoso e flacidez peniana.....	21
1.4.2. Relaxamento do corpo cavernoso e ereção peniana.....	22
1.5. Disfunção erétil e insuficiência cardíaca	23
2. OBJETIVO.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais.....	27
3.2. Indução da insuficiência cardíaca: Modelo de fístula aortocaval	27
3.3. Medida da pressão intracavernosa.....	28
3.4. Estudo funcional da reatividade da musculatura lisa cavernosa in vitro.....	28
3.4.1. Preparo e montagem dos corpos cavernosos.....	28
3.4.2. Curvas concentração-efeito em corpo cavernoso.....	30
3.4.2.1. Avaliação da via de sinalização NO-GCs-GMPc em ratos com insuficiência cardíaca.....	30
3.4.2.2. Avaliação dos mecanismos contráteis em ratos com insuficiência cardíaca.....	30
3.4.3. Curvas frequência – resposta no corpo cavernoso.....	30
3.5. Western blotting.....	31
3.6. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33

4.1. Peso corporal e parâmetros cardíacos.....	33
4.2. Medida da pressão intracavernosa.....	34
4.3. Relaxamento induzido pela acetilcolina em corpos cavernosos de ratos.....	35
4.4. Relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio em corpos cavernosos de ratos.....	36
4.5. Relaxamento induzido pela estimulação elétrica em corpos cavernosos de ratos..	37
4.6. Contração induzido pela fenilefrina em corpos cavernosos de ratos.....	38
4.7. Contração induzido pela estimulação elétrica em corpos cavernosos de ratos.....	39
4.8. Western blotting.....	40
4.8.1. Expressão proteica eNOs.....	40
4.8.2. Expressão proteica nNOS.....	41
4.8.3. Expressão proteica PDE5.....	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8. ANEXO.....	56

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome clínica complexa de caráter sistêmico, definida como disfunção cardíaca e anormalidade estrutural miocárdica que resulta na inabilidade do coração de gerar suprimento sanguíneo para atender as necessidades metabólicas tissulares, na presença de retorno metabólico normal, ou fazê-lo somente com elevadas pressões de enchimento (Bocchi *et al.*, 2005; Mangini, 2009). As alterações hemodinâmicas encontradas na IC envolvem resposta inadequada do débito cardíaco e elevação das pressões pulmonar e venosa sistêmica. Estima-se que a prevalência de ICC acometa 6,4 milhões de pessoas no Brasil e 4,8 milhões de pessoas nos Estados Unidos, tornando-se um importante desafio clínico e um grave problema de saúde pública (Bocchi *et al.*, 2005; American Heart Association). A associação cardiológica de Nova York (NYHA) elaborou uma classificação funcional da doença cardíaca em quatro níveis. No nível I o paciente apresenta doença cardíaca diagnosticada, porém sem limitações, desenvolvendo sintomas apenas com esforços extra-habituais; na classe II o paciente é assintomático em repouso e possui limitação física leve, apresentando sintomas com esforços habituais; na classe III o paciente apresenta sintomas com esforços menores que os habituais e limitação física moderada; na classe IV o paciente apresenta sintomas em repouso e grave limitação física (Yancy *et al.*, 2013). De acordo com o Segundo Consenso de Princeton (The Second Princeton Consensus Conference) os indivíduos com disfunção erétil (DE) são classificados em três riscos cardiovasculares, sendo baixo risco para classe I, risco intermediário para classe II e alto risco para classes III e IV (Kostis *et al.*, 2005). Assim pode se sugerir que a possibilidade e predisposição para o desenvolvimento de DE se relacione com a intensidade do quadro clínico de IC. Apesar dos altos índices de DE associados à IC, faz-se necessário ampliar os conhecimentos para uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos com intuito de melhorar não apenas a qualidade de vida dos pacientes, mas também a sobrevivência desses pacientes.

1.1. Anatomia peniana

O pênis humano é constituído de três porções, dois corpos cavernosos pareados localizados na parte dorsal e um corpo esponjoso na parte ventral. Os corpos cavernosos consistem de estruturas cilíndricas divididas por um septo incompleto, o que os permite funcionar como uma unidade, e são envolvidos em uma túnica sólida, a túnica albugínea, que é fibrosa sendo constituída de colágeno e elastina (Sattar *et al.*, 1994), o que confere rigidez, flexibilidade e resistência ao órgão. O tecido erétil dos corpos cavernosos possui múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por tecido endotelial; a parede dos espaços sinusoidais é formada pela trabécula que é constituída de uma espessa camada de músculo liso e por uma trama fibroelástica composta por elastina, colágeno e fibroblastos (Goldstein *et al.*, 1982; Krane *et al.*, 1989; Awad *et al.*, 2011). O corpo esponjoso envolve a uretra e forma a glândula na porção distal, não contribui para a ereção. A parte proximal do pênis ancora no osso pélvico formando a região denominada crura dos corpos cavernosos, que está envolvida pelo músculo isquiocavernoso. A parte proximal do corpo esponjoso forma o bulbo peniano e está circundado pelo músculo bulbo cavernoso ou bulbo esponjoso. Na parte distal do pênis a glândula peniana possui um vasto plexo venoso que se bifurca formando anastomoses.

O pênis possui um empacotamento neurovascular que contém os nervos sensoriais e artérias dorsais. A inervação do pênis é autonômica (simpática e parassimpática) e somática (sensorial e motora). As inerações autonômicas, simpáticas e parassimpáticas, partem da medula espinal e dos gânglios periféricos formando o nervo cavernoso, este atinge o corpo esponjoso e corpos cavernosos atuando na contração e relaxamento e nos eventos neurovasculares envolvidos nessa dinâmica. A inervação somática é responsável pelas contrações dos músculos bulbo cavernoso e isquiocavernoso (Dean & Lue, 2005); contrações rítmicas do músculo bulbo cavernoso provocam a ejaculação (Giuliano 2011).

A via simpática origina-se do 11º segmento torácico e do 2º lombar, passando através do ramo ventral do nervo espinal em direção à cadeia ganglionar simpática. Algumas fibras dirigem-se através dos nervos esplênicos para os plexos hipogástrico

superior e mesentérico inferior, pelo nervo hipogástrico em direção ao plexo pélvico (De Groat e Booth, 1993; Dean & Lue, 2005).

A via parassimpática é originada do segundo ao quarto segmento sacral. As fibras pré-ganglionares passam do plexo hipogástrico superior pélvico para o plexo pélvico. Nesse ponto os nervos cavernosos se ramificam em direção ao pênis (Walsh *et al.*, 1990). A estimulação do tronco parassimpático através do plexo pélvico e do nervo cavernoso induz ereção, já a estimulação do tronco simpático causa detumescência.

Através de receptores sensoriais localizados no endotélio do pênis, glândula, uretra e no interior dos corpos cavernosos é originada a via somatosensorial. A partir dos receptores as fibras nervosas convergem para o nervo dorsal do pênis, onde se une a outros nervos e forma o nervo pudendo. O nervo pudendo através dos segmentos S2 e S4 da coluna vertebral adentra a mesma até os neurônios espinhais e interneurônios na região cinzenta central do segmento lombo sacral (McKenna, 1998; Dean & Lue, 2005). O centro da inervação somatomotora peniana acontece do segundo ao quarto segmento sacral, conhecido como Núcleo de Onuf, seguindo aos nervos sacrais, nervo pudendo, chegando ao músculo isquio e bulbo cavernosos. A contração do músculo isquiocavernoso participa da fase de relaxamento do corpo cavernoso e ereção peniana, enquanto que o músculo bulbo cavernoso participa da ejaculação através de contrações rítmicas (Dean & Lue, 2005; Giuliano 2011).

1.2. Hemodinâmica da ereção peniana

1.2.1. Suprimento arterial

Em uma das divisões da artéria íliaca interna, no tronco isquiopudendo, é formada a artéria pudenda interna, que é a principal fonte de suprimento sanguíneo para o pênis. Após o tronco perineal no Canal de Alcock, a artéria pudenda interna forma a artéria peniana, que em sua porção final se divide em quatro ramos formados pelas artérias dorsal, esponjosa, cavernosa e bulbar. A artéria dorsal invade o pênis até a glândula, sendo responsável pela rigidez desta durante o estado de ereção. A artéria

uretral fornece suprimento sanguíneo para o tecido uretral, corpo esponjoso e glândula peniana, percorrendo o caminho longitudinal em relação ao corpo cavernoso até a uretra. A artéria cavernosa tem calibre bastante reduzido e adentra o pênis juntamente com as veias e nervos cavernosos. Quando esta artéria invade o tecido cavernoso forma ramificações terminais semelhantes a espirais, quando observadas durante o período de detumescência, essas ramificações suprem os espaços sinusoidais e são chamadas de artéria heliclinais. A artéria bulbar prontamente invade o tecido bulbar, fornecendo sangue para o bulbo uretral proximal e glândula (para revisão ver Pietro, 2008).

1.2.2. Drenagem venosa

A drenagem venosa peniana é realizada pelas veias superficiais, intermediárias e profundas. Entre o tecido erétil e a túnica albugínea estão localizadas as vênulas que realizam a drenagem dos corpos cavernosos; tais vênulas se fundem em veias emissárias maiores, atravessam a túnica albugínea, e drenam em veias penianas extra-tunicais denominadas veias cavernosa e crural (Puech-Leao *et al.*, 1987; Krane *et al.*, 1989). As veias intermediárias partem da glândula peniana formando o plexo retro coronal até a veia dorsal. Os corpos cavernosos são drenados por veias emissárias que atravessam a túnica albugínea. Nas posições medial e distal, estas se fundem em veias circunflexas que seguem para a veia dorsal profunda entre os dois corpos cavernosos, e na posição proximal formam a veia cavernosa atingindo a veia pudenda interna. As veias uretrais e bulbares drenam o corpo esponjoso (para revisão ver Pietro, 2008).

1.2.3. Sistema sinusoidal

Os espaços sinusoidais são formados pelas trabéculas que são constituídas de uma grossa camada de músculo liso e por uma trama fibroelástica composta por elastina, colágeno e fibroblastos, contendo arteríolas e nervos. Desempenham papel

importante nos processos de ereção e detumescência já que possuem ação contrátil e são altamente sensíveis aos estímulos neurológicos (para revisão ver Pietro, 2008).

1.3. Fisiologia da ereção peniana

A musculatura lisa cavernosa, da artéria cavernosa e helicinal, arteríolas e sinusóides, se mantém contraído durante o período de detumescência; há saída livre de sangue através das vênulas subtunicais e das veias emissárias para as veias extra penianas. Nesse estado no pênis flácido a pO_2 varia de 20 a 40 mm Hg (Kim *et al.*, 1993) e o influxo de sangue através da artéria aorta cavernosa é mínimo, atendendo apenas à nutrição do tecido local. Com o bloqueio da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática, ocorre o relaxamento da artéria cavernosa e helicinal, e do músculo liso trabecular que envolve os sinusóides, dilatando os espaços lacunares. Esse relaxamento aumenta a complacência dos corpos cavernosos aumentando o fluxo sanguíneo no tecido cavernoso por força da pressão arterial. O relaxamento e expansão do tecido erétil aumentam a pressão intracavernosa 90-100 mmHg durante o estado de tumescência (Kim *et al.*, 1993). Com a expansão da musculatura lisa trabecular sobre a túnica albugínea, dificulta a saída de sangue do pênis pela compressão das veias subtúnicas e emissárias entre eles. Esse mecanismo chamado de veno-oclusão leva à manutenção da rigidez (Krane *et al.*, 1989; Andersson e Wagner, 1995). Durante o retorno do pênis para o estado flácido, por diminuição da atividade parassimpática e aumento da simpática, a musculatura lisa arteriolar e sinusoidal se contrai novamente, diminuindo o influxo de sangue e a pressão intracavernosa, com isso o bloqueio venoso é removido e a drenagem de sangue dos corpos cavernosos é liberada (para revisão ver Gratzke *et al.*, 2010).

1.4. Mecanismos moleculares de contração e relaxamento do corpo cavernoso

1.4.1. Contração do corpo cavernoso e flacidez peniana

A norepinefrina interagindo com receptores alfa-adrenérgicos mantém a contração do músculo liso arteriolar e impede significativamente o fluxo de sangue para os corpos cavernosos. A manutenção deste estado de contração muscular e flacidez peniana é regulada pelo cálcio citosólico livre, como em toda musculatura lisa. A noradrenalina das terminações nervosas, endotelinas e prostaglandinas do endotélio ativam α -adrenoceptores da musculatura lisa que ativam a fosfolipase C. Esta catalisa a clivagem de fosfatidilinositol em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) que geram aumento dos níveis intracelulares de cálcio. Subsequentemente, o cálcio se liga à calmodulina, o complexo cálcio-calmodulina ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK). A MLCK fosforila a miosina que interage com a α -actina resultando na contração do músculo liso (para revisão ver Berridge, 2008; Gratzke *et al.*, 2010).

1.4.2. Relaxamento do corpo cavernoso e ereção peniana

O óxido nítrico (NO) é o principal neurotransmissor envolvido na mediação da reposta erétil (Toda *et al.*, 2005). É um radical livre gasoso, inorgânico e incolor que possui sete e^- de nitrogênio, oito e^- de oxigênio e um e^- desemparelhado. É formado pela ação das enzimas 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, onde na primeira etapa ocorre a formação do produto intermediário N-hidroxi-L-arginina (Ignarro e 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, nas artérias cavernosa e dorsal (Leone *et al.*, 1994; Ehmke *et al.*, 1995; Hedlund *et al.*, 1999; Mizusawa *et al.*, 2001). 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 helicinais causada pela despolarização do nervo cavernoso leva à liberação de NO do endotélio sinusóide,

como consequência do aumento do fluxo sanguíneo (Musicki *et al.*, 2004).

Desta forma, a regulação da função erétil parece ser mediada pelo NO oriundo de fontes nitrérgicas e endoteliais. O aumento da força de cisalhamento provocado durante a resposta erétil estimula a fosfatidil-inositol 3-kinase (PI3K), fosforilando a proteína quinase B que, por sua vez, fosforila a eNOS, deixando-a mais sensível ao complexo cálcio-calmodulina, levando à geração do 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* 2012).

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 ver Lucas *et al.*, 2000; Priviero e 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 5'GMP, pela ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), cessando assim o processo de ereção peniana (Lucas *et al.*, 2000; Toda *et al.*, 2005; Francis *et al.*, 2010).

1.5. Disfunção erétil e insuficiência cardíaca

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 possui graus e fatores variáveis e pode ser de origem orgânica, neurogênica, psicogênica ou associadas. Na disfunção erétil orgânica, as causas mais comuns são de origem vasculogênica (Agarwal *et al.*, 2006),

sendo este fator a principal causa de DE. Além disso, a deficiência de óxido nítrico tem sido destacada como a principal causa no desenvolvimento da disfunção erétil associada a esses fatores de risco (Bortolotti *et al.*, 1997; Jeremy e Mikhailidis, 1998; Sullivan *et al.*, 1999; Kloner, 2003; Fung *et al.*, 2004; Apostolo *et al.*, 2009). Desta forma, alterações na via de sinalização NO-GCs-GMPc podem estar associadas ao desenvolvimento das alterações da função erétil em pacientes com insuficiência cardíaca.

A insuficiência cardíaca é uma manifestação com sérias consequências na saúde pública mundial sendo responsável por 20% das internações em pacientes maiores de 65 anos, gerando aumento de custos nos tratamentos de saúde, aumento nas hospitalizações e grande diminuição da qualidade de vida dos pacientes (Abassi *et al.*, 2010). O risco de desenvolver insuficiência cardíaca é de 20% para os americanos com mais de quarenta anos de idade, chegando até 80% para os americanos com oitenta anos ou mais (Yancy *et al.*, 2013). Sabe-se que a insuficiência cardíaca crônica é o processo final de várias doenças cardiovasculares, como doença arterial coronariana, miocardite, doença de Chagas entre outras. É caracterizada por disfunção cardíaca e anormalidade estrutural miocárdica, onde o coração é incapaz de ejetar sangue suficiente para as necessidades metabólicas dos tecidos, ou apenas com elevadas pressões de enchimento. Esta enfermidade acomete aproximadamente 5 milhões de americanos, 7 milhões de europeus e 7 milhões de brasileiros. De acordo com uma recente projeção da American Heart Association, é esperado um aumento de 25% na prevalência de IC até 2030, gerando aumento nos custos para acima dos \$95 bilhões (Heidenreich *et al* 2011). A hospitalização desses pacientes representa um prognóstico da clínica da patologia, onde representa aproximadamente 4% na mortalidade hospitalar, aproximadamente 30% da taxa de readmissão em 3-6 meses e 20-35% de mortalidade em um ano após hospitalização (Adams *et al* 2005). Estudos relatam forte associação da insuficiência cardíaca no desenvolvimento da disfunção erétil, com prevalência de 58 a 85 % (Apostolo *et al.*, 2009). Aproximadamente 75% dos pacientes com ICC apresentam diminuição da libido e 30 % relatam ausência de relações sexuais. Apesar da forte associação entre os quadros, os mecanismos envolvidos ainda não estão claramente estabelecidos.

JUSTIFICATIVA

O aumento da incidência de doenças cardiovasculares tem levado a um crescimento significativo na incidência da insuficiência cardíaca tornando-se um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A ICC é o desfecho final da maioria das doenças cardiovasculares, e podem atuar de maneira sinérgica aumentando a predisposição para o desenvolvimento da disfunção erétil. A disfunção do sistema nervoso autônomo e alterações na via de sinalização NO-GCs-GMPc têm sido apontadas como possíveis mediadores das complicações causadas pela ICC. Entretanto, os mecanismos de sinalização intracelulares pelo qual a ICC pode levar a alterações na função erétil ainda não foram elucidados. Desta forma, as alterações morfológicas e funcionais são de grande importância para a busca de um melhor entendimento das disfunções urogenitais e conseqüentemente para a identificação de possíveis alvos terapêuticos para o tratamento destas desordens. O projeto é relevante para a área de saúde pública e qualidade de vida de indivíduos portadores de ICC que apresentam disfunções urogenitais, pois, o presente estudo pode repercutir positivamente não somente para o esclarecimento da fisiopatologia da DE na ICC, como também para a melhora a qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a disfunção erétil (DE) decorrente da insuficiência cardíaca (IC) em ratos Sprague Dawley, procurando explorar as alterações funcionais das respostas relaxantes e contráteis do tecido erétil. Para atingir tais metas, realizamos as seguintes estratégias experimentais:

2.2. Objetivos específicos

- I. Caracterizar a função erétil de ratos com insuficiência cardíaca, através de estudo da pressão intracavernosa em animais anestesiados;
- II. Avaliar as alterações funcionais da via de sinalização do NO nos corpos cavernosos, realizando-se curvas concentração-resposta para a acetilcolina e ao doador de NO, nitroprussiato de sódio;
- III. Avaliar os componentes neurogênicos envolvidos no controle da reatividade da musculatura lisa cavernosa, através do relaxamento nitrérgico e contração neurogênica;
- IV. Caracterizar as alterações proteicas do tecido erétil de ratos com insuficiência cardíaca.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram usados ratos machos da linhagem Sprague Dawley (250-300g). 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 n° 001.06.11).

3.2. Indução da insuficiência cardíaca: Modelo de fístula aortocaval

Os ratos foram previamente anestesiados com ketamina (62 mg/kg) e xilazina (7mg/kg) administrado por via intraperitoneal (IP). Os ratos foram submetidos a tricotomia seguida de laparotomia mediana com dissecação da artéria aorta abdominal e da veia cava inferior, a partir da artéria renal até a origem das artérias ilíacas. Foi realizada oclusão dos vasos por clipagem vascular logo abaixo da artéria renal. Perfuração da artéria aorta perpendicularmente com agulha de 16 G e bisel curto, avanço de 1 cm no interior da artéria, seguida de transfixação para a parede comum com a veia cava, abrindo-se um orifício. A agulha foi retirada, e foi realizada oclusão da punção original com gota de cola de cianocrilato, seguida de retirada da clipagem vascular. Após a criação da fístula é gerado aumento no retorno venoso. O sucesso é obtido com visualização de fluxo arterial para o interior da veia, por transparência. As suturas com fios absorvíveis primeiro foram realizadas nas incisões na musculatura lisa abdominal, em seguida foi suturada a pele do animal. (Brower e Janicki, 2001).

Os animais foram divididos no início do trabalho em dois grupos experimentais:

- Controle Sham (SHAM): os animais deste grupo sofreram intervenção cirúrgica,

foram submetidos ao processo de cessamento de fluxo nos vasos, porém sem a criação da fístula aortocaval;

- Insuficiência cardíaca (IC): os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com indução da fístula aortocaval.

Quatro semanas após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram submetidos aos protocolos experimentais.

3.3. Medida da pressão intracavernosa

O monitoramento da pressão intracavernosa (ICP) foi realizado com o intuito de avaliar a função erétil. Os animais receberam anestesia prévia por via intraperitoneal (IP) com uretano (1,2 g/Kg). Foi colocada cânula dotada de agulha de 26 G, esta foi inserida no corpo cavernoso esquerdo, para que com transdutores de pressão fosse obtido o registro da ICP (Grass, Astro-Med Industrial Park, EUA). Foi realizada laparotomia com posterior dissecação do nervo cavernosos esquerdo, na região dorsolateral da próstata. Foi colocado sobre o nervo cavernoso um eletrodo bipolar de platina ligado a um estimulador (DMT Current stimulator model CS 200, USA). Foram aplicadas diferentes frequências (2, 4, 6, 8 e 10 Hz) gerando estímulos elétricos no nervo cavernoso, (pulso de 1 ms, por 45 s em 6 V). Para efeito de avaliação da atividade erétil *in vivo* os parâmetros utilizados foram ICP basal e ICP após os estímulos elétricos.

3.4. Estudo funcional da reatividade da musculatura lisa cavernosa *in vitro*

3.4.1. Preparo e montagem dos corpos cavernosos

Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório 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; NaHCO₃, 14.9; dextrose, 5.5; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄·7H₂O, 1.17 e CaCl₂·2H₂O, 1.6. Após a remoção da veia dorsal, uretra, tecidos conjuntivos 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 foram obtidos de cada animal, com peso aproximado de 0,25 g cada segmento.

Os tecidos foram montados em sistemas para órgão isolado (10 ml) preenchidos com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerado com O₂:CO₂ (95:5%) e mantidos à temperatura de 37°C. Os segmentos de corpo cavernoso foram fixados em entre as unidades fixa do sistema, sendo aplicada tensão de 5 mN ajustada periodicamente até o período de estabilização (60 min), com troca da solução de Krebs a cada 15 minutos. Para verificação das alterações de tensão foram usados transdutores isométricos (AD Instruments, Austrália) em sistema PowerLab 4/30 de aquisição de dados (software versão 7.2, AD Instruments, Austrália). Para os nervos foi realizada estimulação elétrica (EFS), no qual os tecidos foram montados entre dois eletrodos de platina paralelamente dispostos, com indução por Grass S88 (Astro-Med Industrial Park, EUA), por geração de pulsos de 1 ms de duração a 50 V em frequências variadas (1-32 Hz).

A viabilidade dos tecidos foi verificada pela contração induzida pelo KCl (80 mM) ao banho, substituindo o NaCl, mantendo a osmolaridade da solução nutritiva. Foram considerados viáveis os tecidos que apresentarem resposta contrátil ao KCl, sendo assim, 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 ficará representado nas 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 foram calculados pelo uso da seguinte equação:

$$E = E_{\max} / [(1 + (10c/10X)^N) + \Phi]$$

Onde:

- E é elevação do tônus basal;

- Emax 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;
- Φ é a resposta observada na ausência do agonista.

3.4.2. Curvas concentração-efeito em corpo cavernoso

3.4.2.1. Avaliação da via de sinalização NO-GCs-GMPc em ratos com insuficiência cardíaca

Foram construídas curvas dependentes da concentração de nitroprussiato de sódio (SNP; 10nM – 1mM) que é um doador de óxido nítrico e dependentes da concentração de acetilcolina (Ach; 10nM –1mM) que possui ação agonista muscarínico, em tecidos pré contraídos com fenilefrina (PE; 10 μ M).

3.4.2.2. Avaliação dos mecanismos contráteis em ratos com insuficiência cardíaca

A avaliação dos mecanismos contráteis se dará por construção de curvas dependentes da concentração de fenilefrina (10nM – 100 μ M), que é um agonista de receptores α 1 - adrenérgicos, com ação simpaticomimética direta, assim promovendo contração muscular.

3.4.3. Curvas frequência – resposta no corpo cavernoso

Foi realizada estimulação elétrica de campo nos nervos autonômicos (EFS) colocando os tecidos montados entre dois eletrodos de platina. Os tecidos sofreram

tratamento prévio com guanetidina (30 μ M), gerando esgotamento molecular das terminações adrenérgicas e com atropina (1 μ M) gerando bloqueio da resposta muscarínica. Os tecidos sofreram estimulação elétrica a uma voltagem de 50 V, em pulsos de 1 ms, com intervalos de 0,2 ms, por 10s, em frequências 1,2,4,8,16 e 32 Hz, com intervalo de 3 minutos entre os estímulos. Foi utilizado aparelho Grass Telefactor S88 (West Warwick, RI, EUA). Respostas expressas em nN/mg de peso úmido do “strip”. A avaliação da resposta contrátil induzida pelo EFS, em tecidos com tônus basal, ocorreu de acordo com experiência prévia como descrito por Teixeira e colaboradores (1998) e Claudino e colaboradores (2009).

3.5. Western Blotting

Os tecidos dos corpos cavernosos foram removidos, isolados e congelados à - 80° C. Posteriormente foram triturados em aparelho Polytron na presença de tampão de extração (EDTA 200 mM, Trisma base 1M, pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio, ortovanato de sódio, PMSF, etanol, aprotinina e H₂O). Posteriormente adicionado Triton 10 % na proporção de 10 % do volume de tampão de extração e repouso no gelo por 40 minutos. Finalmente centrifugação por 20 minutos à 4° C em 12000 rpm e sobrenadante mantido à -80° C.

As amostras passaram por dosagem proteica (Bioclin) em triplicata, foram adicionados 10 μ L de amostra no tubo amostra, 10 μ L de padrão no tubo padrão e 500 μ L de Biureto em todos os tubos. Após homogeneização e repouso de 10 minutos foi realizada leitura em 545 nm (510 - 550 nm) em espectrofotômetro, acertando o zero com o Branco (apenas Biureto). Após a dosagem foi adicionado solução de Laemmli (Laemmli, 1970), e foram aplicadas em volumes padronizados em gel de poliacrilamida para corrida e separação proteica. Posteriormente ocorrerá a transferência das bandas geradas no gel para membrana de nitrocelulose. Para bloquear os sítios inespecíficos as membranas foram mantidas em solução de caseína por uma hora.

As membranas então foram incubadas com anticorpos primários específicos para óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e

fosfodiesterase tipo-5 (PDE5). Posteriormente as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos aos anticorpos primários utilizados. As bandas imunorreativas foram reveladas por utilização de kit de quimiluminescência. De acordo com o peso molecular de cada proteína, a localização da banda desejada foi visualizada por comparação com posição do marcador de peso molecular, este com cada faixa de peso e cor conhecida. A intensidade das bandas marca a expressão proteica e foi determinada por análise em software Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), com posterior geração de gráficos em programa “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3.6. Análise estatística

Valores experimentais de contração foram calculados em relação à contração máxima produzida pelos agonistas no corpo cavernoso dividido pelo peso úmido de tecido. Os valores de relaxamento em relação à contração máxima produzida pela fenilefrina (10 μ M), os quais foram tomados como 100%. Valores de EC_{50} foram apresentados como o logaritmo negativo (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. Teste t não-pareado de Student foi utilizado para comparação dos grupos analisados. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Peso corporal e parâmetros cardíacos

Ambos os grupos analisados não apresentaram diferenças significativas nos valores de peso corporal inicial. Além disso, os grupos apresentaram um aumento significativo do peso após 4 semanas, sendo que, esse aumento não foi significativamente diferente em nenhum dos grupos analisados (Tabela 01). Após 4 semanas do procedimento cirúrgico a pressão arterial média também não foi alterada tanto no grupo SHAM (91 ± 11 mmHg) como no grupo IC (105 ± 15 mmHg; Tabela 01). Para a análise do desenvolvimento da IC foram utilizados simples parâmetros como o peso da massa cardíaca total (coração) e a massa do ventrículo isolado esquerdo. Nossos resultados mostraram que após 4 semanas os animais do grupo IC apresentaram um significativo aumento tanto da massa cardíaca total (MCT; $2,31 \pm 0,23$ g*) como da massa do ventrículo esquerdo isolado (VE; $1,65 \pm 0,14$ g*) quando comparado ao grupo SHAM (MCT = $1,55 \pm 0,02$ g; VE = $1,14 \pm 0,01$). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Tabela 1. Peso corporal, pressão arterial média, massa cardíaca total e massa do ventrículo esquerdo isolado de animais SHAM e IC após 4 semanas do processo de indução da fistula aortocaval.

Grupos	Peso corporal (g)		Pressão arterial média (mmHg)	Massa cardíaca total (g)	Massa VE isolado (g)
	Inicial	Final	Final	Final	Final
SHAM	301 ± 12	417 ± 15 (7)	91 ± 11 (5)	$1,55 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,01$
IC	308 ± 4	403 ± 14 (8)	105 ± 15 (5)	$2,31 \pm 0,23$ *	$1,65 \pm 0,14$ *

* $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

4.2. Medida da pressão intracavernosa.

A função erétil avaliada através da medida da pressão intracavernosa “in vivo”. Os animais do grupo IC não apresentaram alterações significativas na pressão intracavernosa basal ($10,78 \pm 3,78$ mmHg) quando comparado ao grupo Sham ($9,85 \pm 1,38$ mmHg; Figura 1A). Entretanto, os valores de ICP, nas maiores frequências (6, 8 e 10 Hz), foram significativamente menores nos animais-IC quando comparados ao grupo controle (Figura 1B).

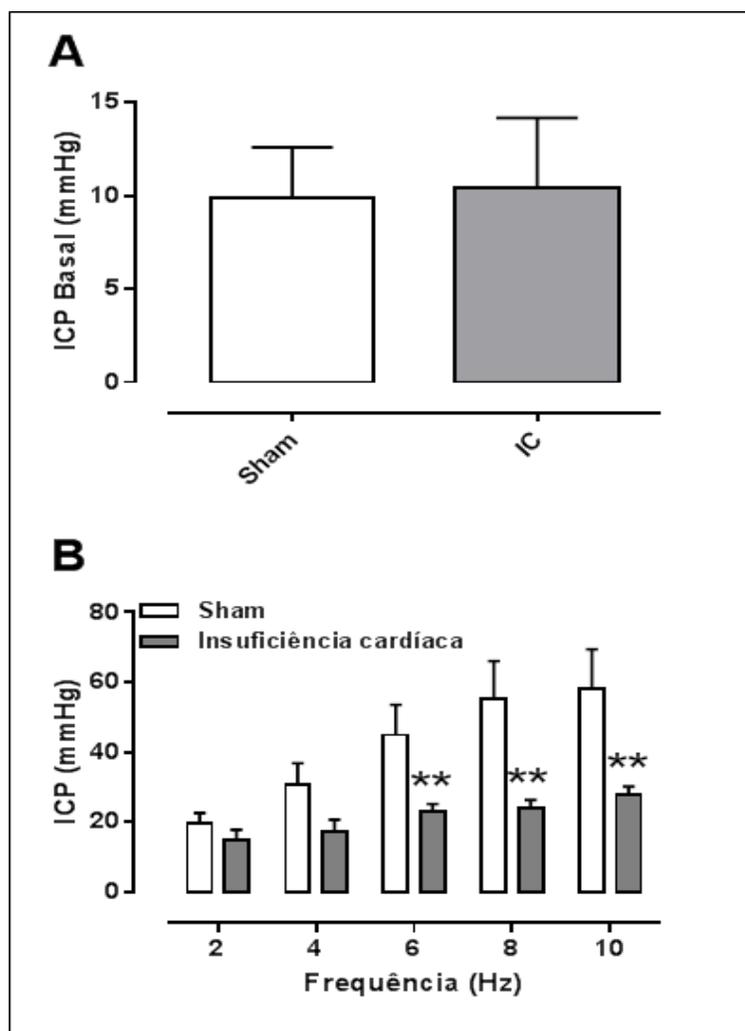


Figura 1: Avaliação da resposta erétil *in vivo* pela estimulação do nervo cavernoso de ratos controle (SHAM) e de ratos com insuficiência cardíaca (IC). Valores de ICP basal (painel A) e valores de ICP após estímulo (painel B). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 4 - 5 experimentos. ** $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.3. Relaxamento induzido pela acetilcolina em corpos cavernosos de ratos

O relaxamento dependente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito a acetilcolina (ACh; 1nM - 1mM) em corpo cavernoso de ratos, pré-contraídos com fenilefrina (PE, 10 μ M). A adição cumulativa de ACh promoveu um relaxamento dependente da sua concentração na musculatura lisa do corpo cavernoso de ratos apresentando uma potência (pEC_{50}) de $5,07 \pm 0,32$ e resposta máxima (E_{max}) de $39 \pm 3\%$. Porém, os animais-IC não apresentaram alterações significativas nos parâmetros farmacológicos analisados (pEC_{50} : $5,11 \pm 0,27$; E_{max} : $35 \pm 3\%$; Figura 2).

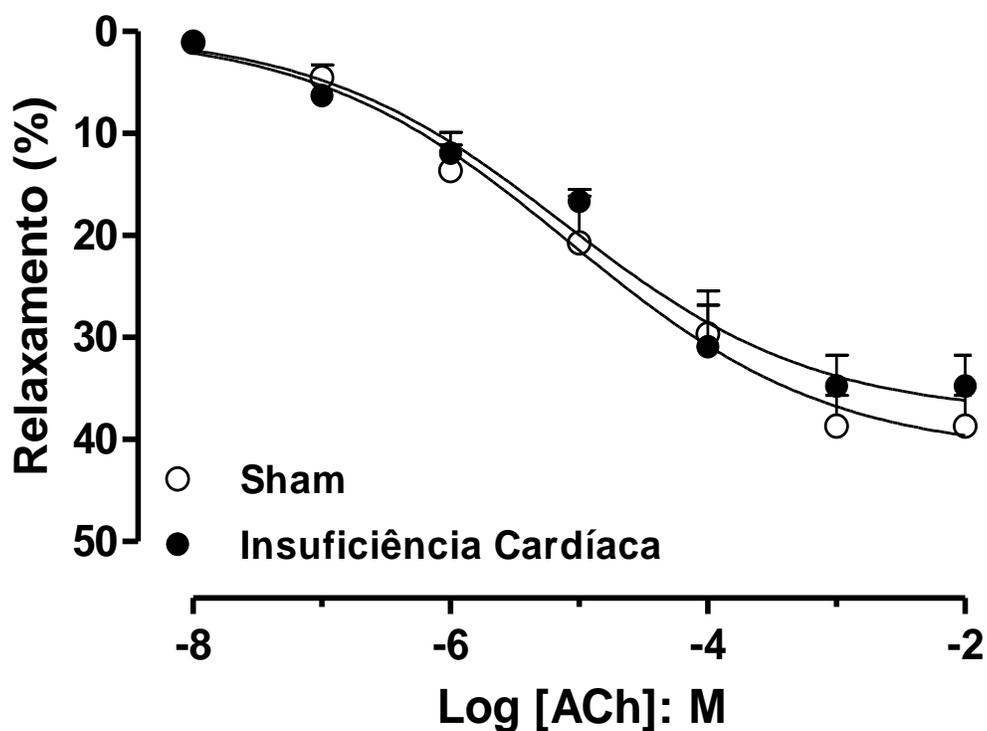


Figura 2: Curvas concentração-efeito à ACh (10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos controle (SHAM) e ratos com insuficiência cardíaca (IC). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela PE (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5 experimentos.

4.4. Relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio em corpos cavernosos de ratos

O relaxamento independente de endotélio foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito ao SNP (10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos, pré-contráidos com fenilefrina (10 μ M). A adição cumulativa de SNP promoveu um relaxamento dependente de sua concentração na musculatura lisa do corpo cavernoso de ratos, apresentando uma potência (pEC_{50}) de 5.35 ± 0.33 e resposta máxima (E_{max}) de $87 \pm 6\%$. Entretanto, os animais-IC não apresentaram alterações significativas nos parâmetros farmacológicos analisados (pEC_{50} : $5,48 \pm 0,12$; E_{max} : 82 ± 4 ; Figura 3).

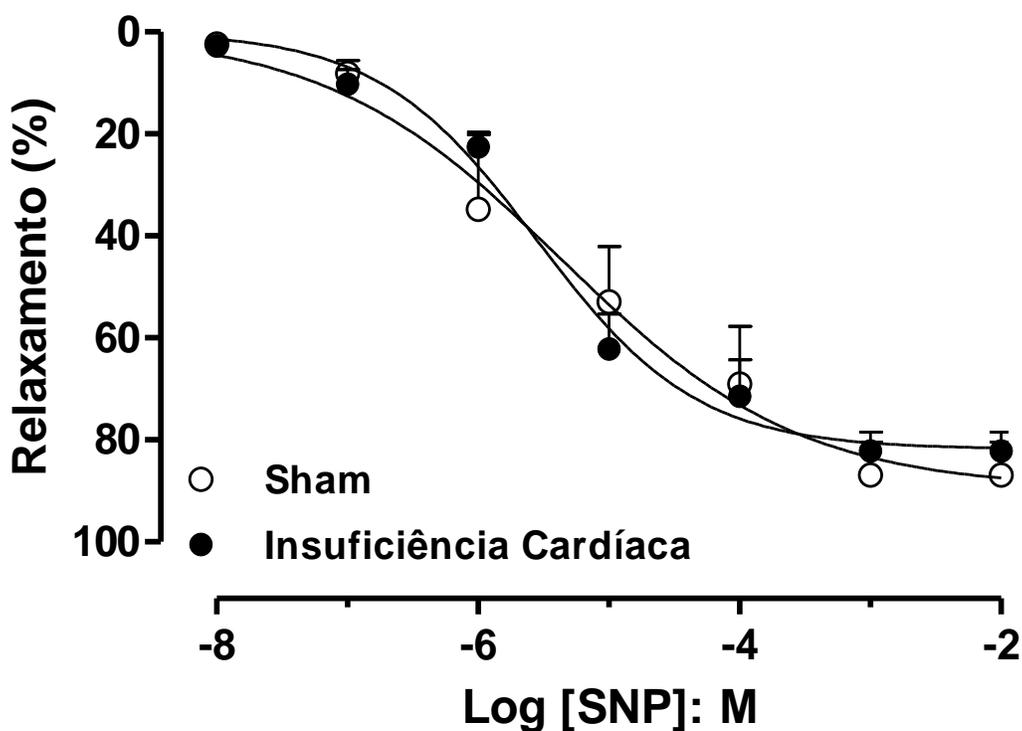


Figura 3 Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (SNP, 10 nM – 1 mM) em corpo cavernoso de ratos controle (SHAM) e ratos com insuficiência cardíaca. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela PE (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 5-7 experimentos.

4.5. Relaxamento induzido pela EFS em corpos cavernosos de ratos

O relaxamento nitrérgico foi avaliado através da construção de curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico (EFS 1-32 Hz). O EFS promoveu um relaxamento dependente de sua frequência na musculatura lisa cavernosa de ratos, os tecidos foram previamente tratados com guanetidina (30 μ M; depletor das terminações adrenérgicas) e atropina (1 μ M; antagonista muscarínico) e após um período de 30 minutos foram pré-contraídos com fenilefrina (10 μ M). Os animais-IC apresentaram uma redução significativa do relaxamento da musculatura lisa cavernosa nas maiores frequências avaliadas (8, 16 e 32 Hz), quando comparados ao grupo controle (Figura 4).

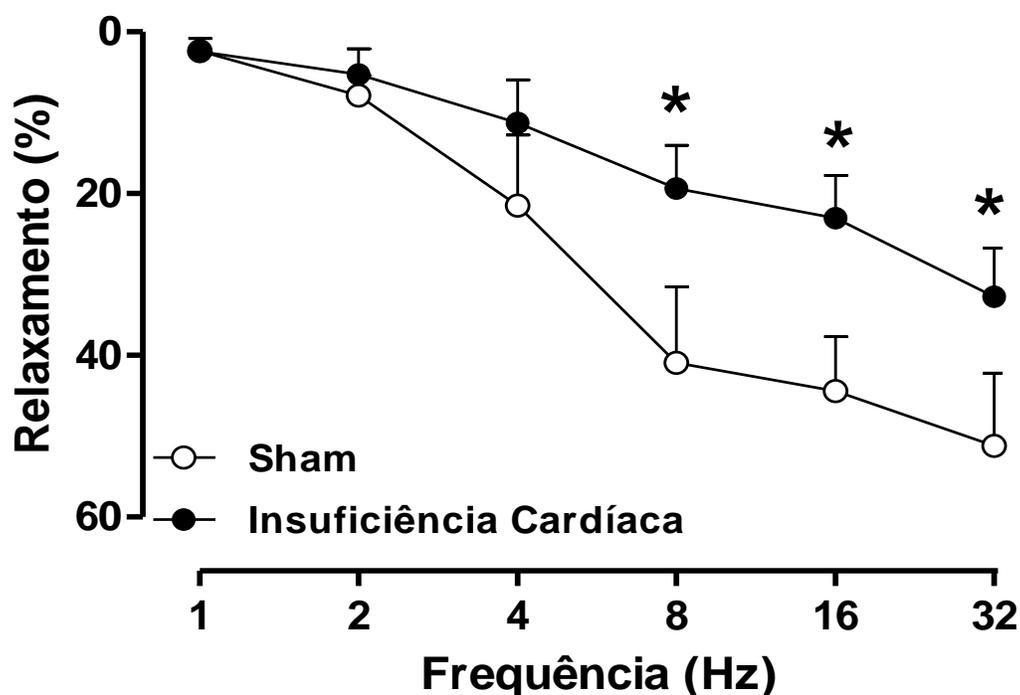


Figura 4: Curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico (EFS 1-32 Hz) em corpo cavernoso de ratos controle (SHAM), e ratos submetidos ao processo de fístula aortocaval (IC). O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela PE (10 μ M), que foi tomada como 100%. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 4-7 experimentos. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM.

4.6. Contração induzida pela fenilefrina em corpos cavernosos de ratos

O mecanismo contrátil foi avaliado através da construção de curvas concentração-efeito a fenilefrina (PE; 10nM - 100µM) em corpo cavernoso de ratos em tônus basal. A adição cumulativa de PE promoveu uma contração dependente de sua concentração na musculatura lisa cavernosa de ratos apresentando uma potência (pEC_{50}) de $5,45 \pm 0,04$ e resposta máxima (E_{max}) de $0,019 \pm 0,001$ mN/mg de tecido. Os animais-IC não apresentaram alterações significativas nos valores de pEC_{50} ($5,37 \pm 0,04$) quando comparado ao grupo controle, porém, a contração máxima promovida pela PE foi significativamente aumentada no grupo IC ($0,025 \pm 0,001$ mN/mg de tecido; Figura 5).

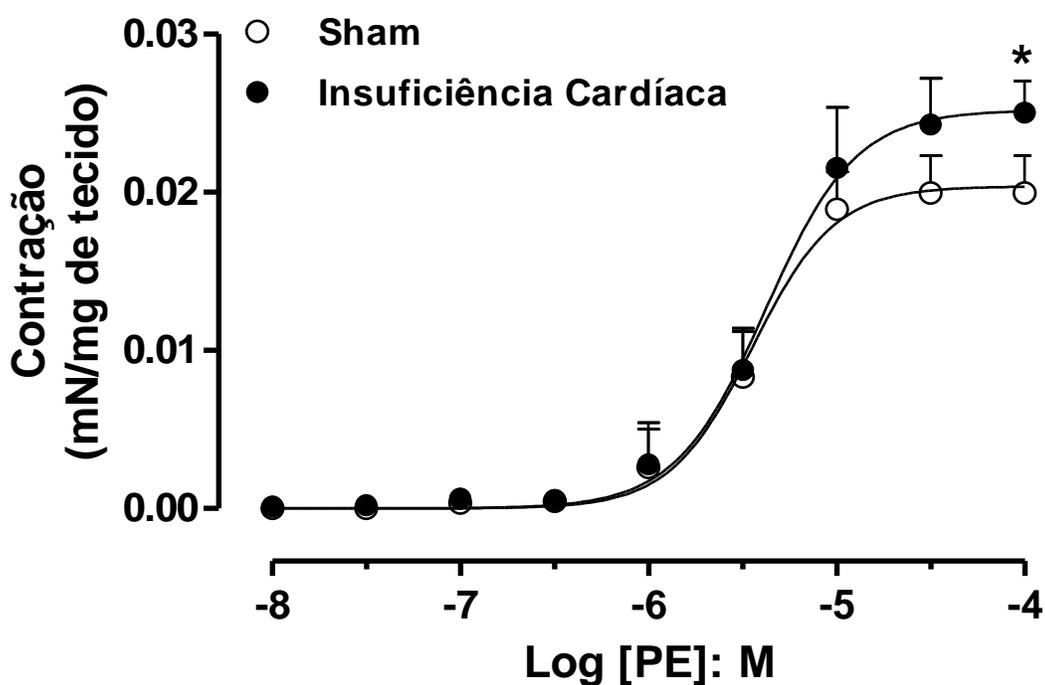


Figura 5: Curvas concentração-efeito a fenilefrina (PE 10 nM – 100 uM) em corpo cavernoso de ratos controle (SHAM), e ratos com insuficiência cardíaca. Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 7 experimentos. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM.

4.7. Contração induzida pela estimulação elétrica em corpos cavernosos de ratos

A contração neurogênica foi avaliada através da construção de curvas frequência-resposta ao estímulo elétrico (EFS 1-32 Hz). O EFS promoveu uma contração dependente de sua frequência na musculatura lisa cavernosa de ratos, os tecidos foram previamente tratados com L-NAME (100 μ M; inibidor inespecífico das enzimas óxido nítrico sintase) e atropina (1 μ M; antagonista muscarínico), em tônus basal. Os animais-IC apresentaram aumento significativo da resposta contrátil máxima (32 Hz), quando comparados ao grupo controle (Figura 6).

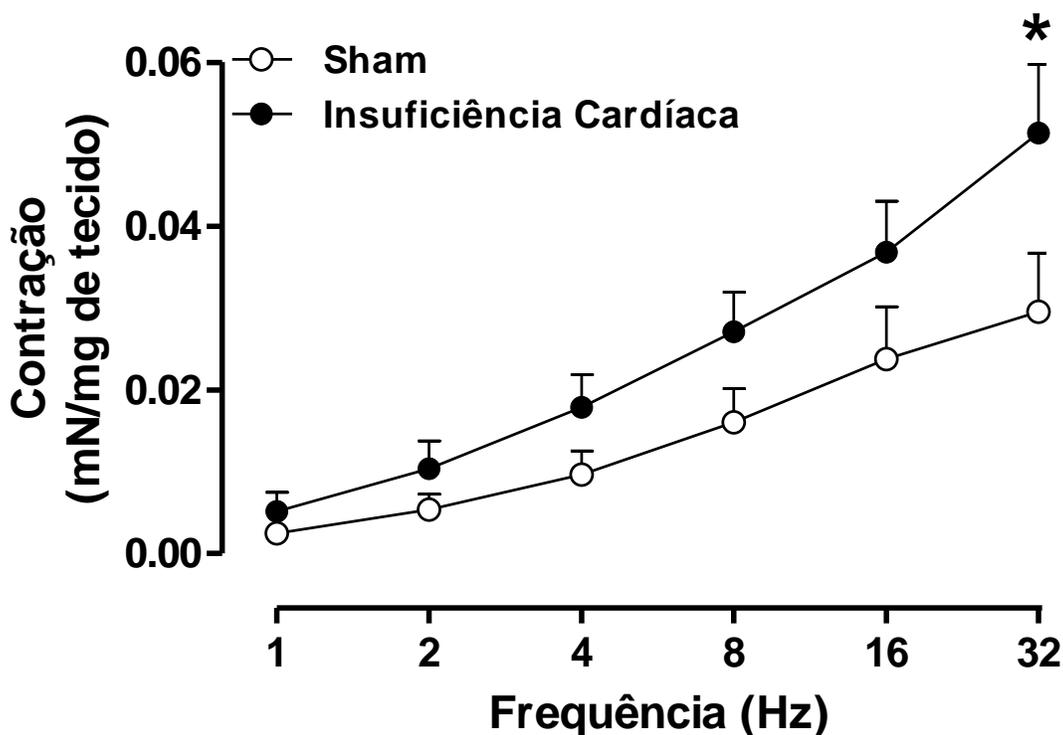


Figura 6: Curvas concentração-resposta ao estímulo elétrico (EFS, 1-32 Hz) em corpo cavernoso de ratos controle (SHAM), e ratos submetidos ao processo de fístula aortocaval (IC). Os dados representam as médias \pm erro padrão da média de 6 experimentos. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM.

4.8. Western blotting

4.8.1. Expressão proteica da eNOS

Os animais submetidos à indução da fístula aortocaval (IC) apresentaram significativa redução da expressão proteica da eNOS (38%), em comparação aos animais controle (SHAM), valores estes corrigidos pela expressão da proteína estrutural α -tubulina.

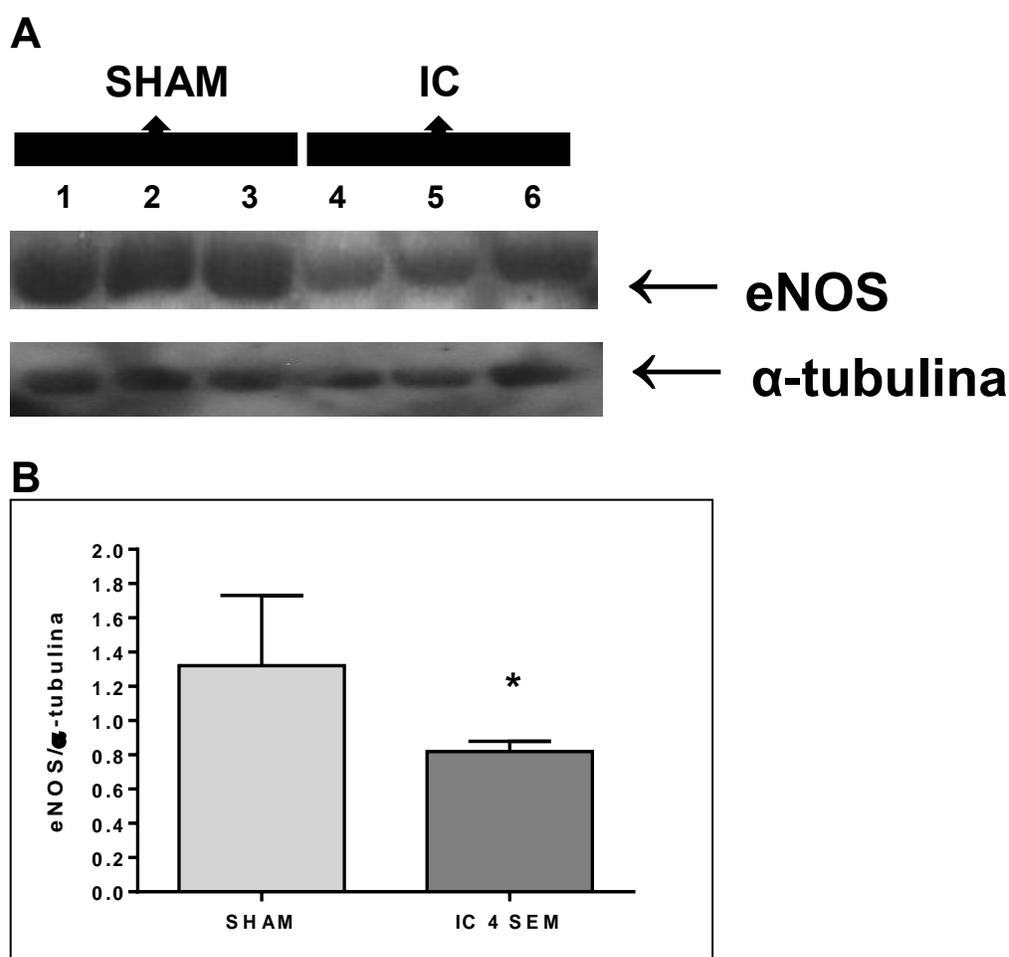
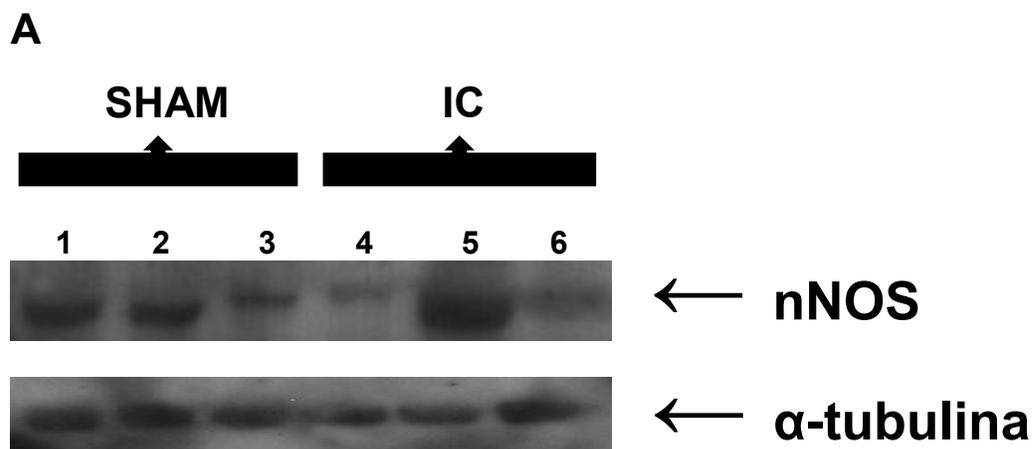


Figura 7: Expressão proteica de eNOS em corpo cavernoso de ratos controle (SHAM) e ratos submetidos à indução da fístula aortocaval (IC). Western blotting representativo para eNOS e α -tubulina (painel A), densitometria para eNOS (painel B). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 3 experimentos, corrigindo a expressão da eNOS pela expressão da α -tubulina. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM.

4.8.2. Expressão proteica da nNOS

Os animais submetidos à indução da fístula aortocaval (IC) apresentaram redução da expressão proteica da nNOS (44%), em comparação aos animais controle (SHAM), com valores corrigidos pela expressão da proteína estrutural α -tubulina.



B

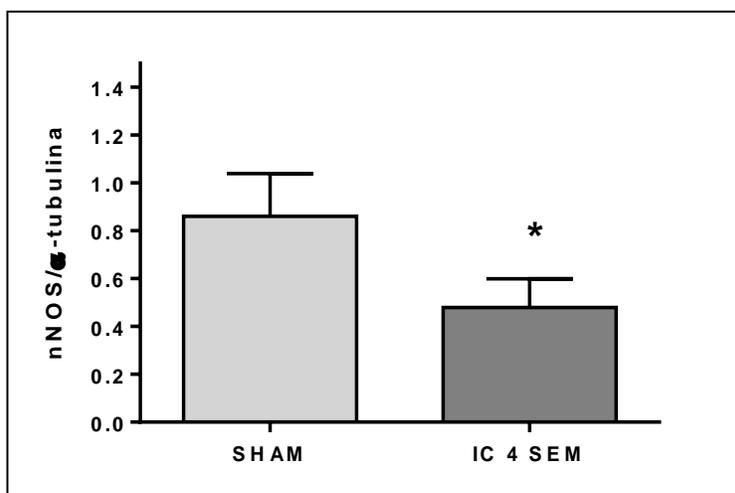
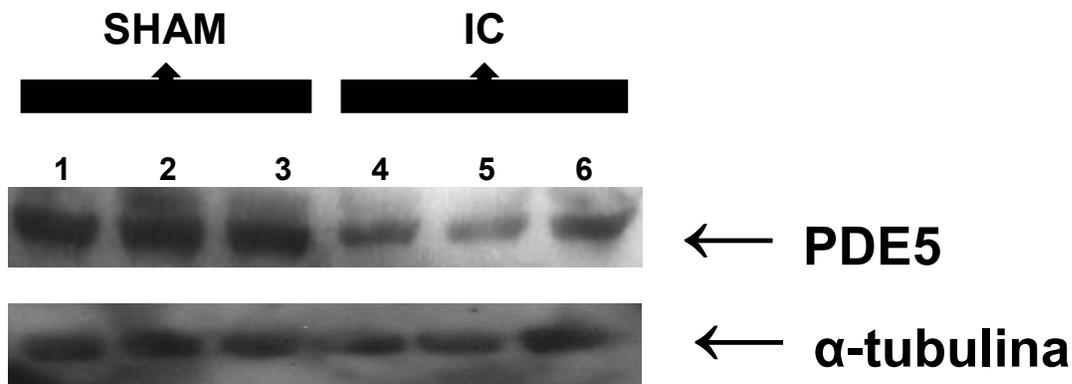


Figura 8: Expressão proteica de nNOS em corpo cavernoso de ratos controle e ratos submetidos à indução da fístula aortocaval. Western blotting representativo para nNOS e α -tubulina (painel A), densitometria para nNOS (painel B). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 3 experimentos, corrigindo a expressão da nNOS pela expressão α -tubulina. * $P < 0,05$ comparado com o grupo SHAM.

4.8.3. Expressão proteica de PDE5

Os animais submetidos à indução da fístula aortocaval (IC) apresentaram redução significativa da expressão proteica da PDE5 (53%), em comparação aos animais controle (SHAM), valores estes corrigidos pela expressão da proteína estrutural α -tubulina.

A



B

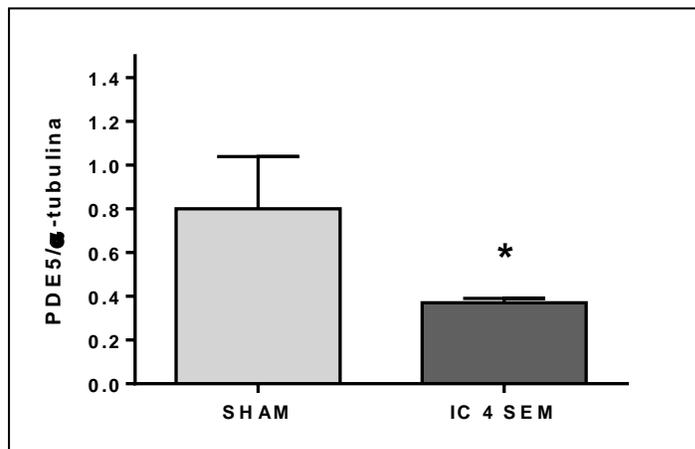


Figura 9: Expressão proteica de PDE5 em corpo cavernoso de ratos controle (SHAM) e ratos submetidos à indução da fístula aortocaval (IC). Western blotting representativo para PDE5 e α -tubulina (painel A), densitometria para PDE5 (painel B). Os dados representam as médias \pm E.P.M. para 3 experimentos, corrigindo a expressão da PDE5 pela expressão da α -tubulina. *P<0,05 comparado com o grupo SHAM.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo é pioneiro ao avaliar a fisiopatologia da disfunção erétil (DE) associada à insuficiência cardíaca (IC), uma vez que a associação dessas desordens tem como base estudos epidemiológicos. Nossos resultados mostram que após 4 semanas do procedimento de indução da IC, pela indução da fístula aortocaval (FAV), ocorre um comprometimento da função erétil devido a alterações nas vias de sinalização (contração e relaxamento) responsáveis pelo controle do tônus da musculatura lisa cavernosa.

A IC é uma síndrome complexa que envolve múltiplos sistemas e mecanismos compensatórios neuro-humorais, com manifestações periféricas como a disfunção endotelial, alterações musculares esqueléticas, anormalidades de fluxo sanguíneo, e do controle quimiorreflexo ventilatório (Packer, 1992; Jessap, 2003). A estimulação neuro-humoral com aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina consiste em um grande marcador da IC, e torna o prognóstico da doença bastante negativo, com aumento do processo inflamatório, das ativações progressivas do sistema renina – angiotensina – aldosterona e do sistema nervoso simpático, levando à piora da capacidade física e redução na qualidade de vida. Estes sintomas são decorrentes de uma complexa resposta fisiopatológica à disfunção ventricular e conseqüente diminuição da oferta de oxigênio aos tecidos (Hunt *et al.*, 2005). Em especial o débito cardíaco reduzido e a resistência vascular sistêmica aumentada estimulam gradativamente o sistema nervoso simpático em repouso e durante o exercício, elevando a função cardíaca, reduzindo a variabilidade da frequência cardíaca e elevando a tonicidade simpática vasoconstritora. Estes estímulos fazem com que o coração precise de mais força para comportar um maior débito cardíaco, além de mais força para aumentar a o volume de sangue ejetado. Esse esforço exacerbado gera hipertrofia na musculatura miocárdica (Hunt *et al.*, 2005). Os resultados dos parâmetros cardíacos mostram que os animais submetidos ao processo de indução da FAV apresentaram aumento significativo na massa cardíaca total, aumento este de aproximadamente 50% em relação aos animais controle. A análise da massa do ventrículo esquerdo isolado se faz importante devido ao fato deste ser responsável pelo bombeamento de sangue para a circulação

sistêmica, onde em caso de IC tanto a força de bombeamento como a massa ventricular esquerda estariam aumentadas. A análise deste parâmetro evidencia que os animais que sofreram processo de indução da FAV apresentaram significativo aumento na massa do ventrículo esquerdo isolado, aumento em torno de 45% em relação aos animais controle (Abassi, 2010). Assim, as alterações hemodinâmicas, no período de 4 semanas, foram suficientes para promover alterações estruturais cardíacas nesses animais, porém não podemos afirmar que tais alterações comprometeram a função de ejeção cardíaca.

Sabe-se que a IC e DE apresentam fatores de riscos semelhantes como, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (para revisão Apostolo et al., 2009). Esses fatores de riscos estão associados à disfunção do sistema nervoso autônomo e alterações em importantes vias de sinalização como, a via do óxido nítrico-guanilil ciclase solúvel-guanosina monofosfato cíclico (NO-GCs-GMPc). Evidências clínicas e experimentais indicam que a redução da disponibilidade de NO e/ou da reatividade ao NO endógeno leva à disfunção endotelial prejudicando a função erétil tanto em animais como humanos (Blanco *et al.*, 1990; Azadzoï & Saenz de Tejada, 1991).

Considerando que o óxido nítrico (NO) é fundamental para a ereção peniana (Andersson & Wagner 1995; Ignarro, 2002), especulamos que o comprometimento da função erétil, observado na avaliação da pressão intracavernosa (*in vivo*), estava associado à redução da biodisponibilidade de NO. O NO quando liberado de fibras nitrérgicas ou do endotélio, se difunde para células musculares lisas adjacentes e se liga ao seu receptor fisiológico intracelular, a guanilil ciclase solúvel (GCs). 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 (Lucas *et al.*, 2000; Priviero & Webb, 2010). Nossos resultados (*in vitro*) mostraram que a avaliação do relaxamento da musculatura lisa cavernosa através da liberação de NO oriundo de endotélio, induzido pela acetilcolina, não foi alterado nos animais com IC. Resultados semelhantes foram observados ao avaliar o relaxamento da musculatura lisa cavernosa independente de

endotélio, induzido pelo nitroprussiato de sódio (doador de NO). Entretanto, a expressão proteica da eNOS foi significativamente reduzida no corpo cavernoso de ratos com insuficiência cardíaca, resultados semelhantes foram encontrados em corpo cavernoso de animais com doenças cardiovasculares (Park *et al.*, 2005; Castela *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). O fato de a resposta relaxante induzida pela acetilcolina não ter sido alterada significativamente pode ser devido à existência de uma pequena população de receptores muscarínicos neste tecido. Esses dados estão de acordo com a baixa resposta relaxante induzida pelo agonista muscarínico, carbacol, em corpo cavernoso de ratos (Hedlund *et al.*, 1999), porém, nossos dados mostram que após 4 semanas do processo aortocaval os animais apresentam um possível comprometimento na biodisponibilidade de NO oriundo de endotélio mas sem lesão endotelial no tecido cavernoso.

Dando continuidade à análise dos mecanismos de relaxamento no pênis, avaliamos o relaxamento nitrérgico induzido pelo EFS, bem como a expressão proteica da nNOS, enzima amplamente presente em toda a inervação peniana (Toda & Okamura, 2003), o estímulo do nervo cavernoso induz ereção peniana, o qual é completamente abolido pelos inibidores da NOS e reduzido em animais nocautes para nNOS (Burnet *et al.*, 1992; Trigo-Rocha *et al.*, 1993, 1995). A despolarização neuronal promove a entrada de cálcio no meio intracelular formando o complexo cálcio/calmodulina que se associa à nNOS e estimula a formação do NO iniciando o processo de ereção peniana (Hurt *et al.*, 2002). Além disso, estudo recente demonstrou que a nNOS também participa do processo de manutenção da ereção peniana, esse processo ocorre através da ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) que fosforila a nNOS (P-nNOS), através do sítio de serina S1412 (Hurt *et al.*, 2012). Nossos resultados mostram que os animais com insuficiência cardíaca apresentaram uma redução significativa tanto do relaxamento nitrérgico da musculatura lisa cavernosa como da expressão proteica da nNOS. Esses dados corroboram com nossa avaliação *in vivo*, onde, os animais com insuficiência cardíaca apresentaram uma redução da pressão intracavernosa. Desta forma sugerimos que a redução da expressão proteica da eNOS e nNOS associado a redução do relaxamento nitrérgico promove redução da pressão intracavernosa e comprometimento da função erétil, levando ao

desenvolvimento da disfunção erétil em ratos com IC.

No processo da ereção peniana, a ação da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), é hidrolisar o GMPc a 5'GMP, cessando assim a resposta erétil (Lucas *et al.*, 2000; Toda *et al.*, 2005), paradoxalmente, nossos resultados mostraram redução da expressão proteica da PDE5 no corpo cavernoso de ratos com insuficiência cardíaca, sugerindo possível mecanismo compensatório por diminuição da biodisponibilidade de NO. Diversos trabalhos têm mostrado em modelos animais que apresentam redução da biodisponibilidade de NO uma regulação negativa da atividade da PDE5 como um mecanismo compensatório no processo de ereção peniana (Champion *et al.*, 2005; Bivalacqua *et al.*, 2012; 2013).

As alterações cardíacas decorrentes da IC podem comprometer diversos mecanismos de controle de tônus da musculatura lisa vascular ou não vascular, assim, dando sequência ao trabalho avaliamos os mecanismos de contração do tecido cavernosos. O grau de contração do músculo liso do corpo cavernoso determina os estados funcionais de flacidez peniana, tumescência, ereção ou detumescência (Andersson & Wagner, 1995). O balanço entre fatores contráteis e relaxantes é controlado por sua vez por mecanismos centrais e periféricos (Andersson, 2003). Nas diferentes manifestações da disfunção erétil (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 (Mills *et al.*, 2001). A neurotransmissão noradrenérgica (simpática) tem 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, sendo responsável pelo estado flácido do pênis (Andersson, 2001). Uma vez liberada, a noradrenalina estimula α -adrenoceptores (α_1), causando contração da vasculatura peniana e do músculo liso trabecular do corpo cavernoso (Andersson & Wagner, 1995). Diversos trabalhos mostram que o mecanismo contrátil pode levar ao comprometimento da reatividade da musculatura lisa cavernosa bem como ao comprometimento da função erétil em diferentes estados patológicos (Baraghoush *et al.* 2010). Nossos resultados mostraram que tanto a contração neurogênica como a resposta mediada pelo agonista adrenérgico α_1 (PE) estão

aumentadas nos animais com insuficiência cardíaca, podendo contribuir para o agravamento da disfunção erétil associado à insuficiência cardíaca.

Desta forma, nossos resultados mostraram que a redução do relaxamento nitrérgico e aumento da contração neurogênica da musculatura lisa cavernosa em ratos com IC (ex vivo), associados à diminuição da expressão proteica no tecido erétil das enzimas precursoras de óxido nítrico nNOS e eNOS (ex vivo), promoveu a redução da pressão intracavernosa (in vivo) e comprometimento da função erétil. Assim, as alterações hemodinâmicas, características do modelo experimental, promoveram o desenvolvimento da disfunção erétil em ratos com IC, esses dados repercutem positivamente não somente para o esclarecimento da fisiopatologia da DE na ICC, como também para a melhora a qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes.

6. CONCLUSÃO

O aumento do mecanismo contrátil associado à redução do mecanismo de relaxamento contribui para o desequilíbrio no controle do tônus muscular cavernoso, bem como sua manutenção, e conseqüentemente, favorece o desenvolvimento da disfunção erétil associado à IC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abassi, Z.; Goltsman, I.; Karram, T.; Winaver, J.; Hoffman, A. Aortocaval Fistula in Rat: A Unique Model of Volume-Overload Congestive Heart Failure and Cardiac Hypertrophy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

Adams, V.; Linke A.; Kränkel, N.; Erbs, S.; Gielen, S.; Möbius-Winkler, S.; Gummert, J.; Mohr, F.; Schuler, G.; Hambrecht, R. Impact of regular physical activity on the NADPH oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. **Circulation**. 111(5):555-62, 2005.

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.

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

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

Awad, A.; Alsaid, B.; Bessede, T.; Droupy, S.; Benoît G. Evolution in the concept of erection anatomy. **Surg Radiol Anat.**;33(4):301-12. doi: 10.1007/s00276-010-0707-4. Epub 2010 Aug 5. Review, 2011.

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

Baraghoush, A.; Phan, A.; Wilix Jr., R. D.; Schwarz, E. R.. Erectile dysfunction as a complication of heart failure. **Curr Heart Failure Rep**, 7: 194-201, 2010.

Blanco, R.; Saenz De Tejada, I.; Goldstein, I.; Krane, R. J.; Wotiz, H. H.; Cohen, R. A. Dysfunctional penile cholinergic nerves in diabetic impotent men. **J Urol.**, 144: 278-280,

1990.

Berridge, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **J Physiol.** 1; 586: 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.

Bivalacqua, T. J.; Usta, M. F.; Champion, H. C.; Kadowitz, P. J. and Hellstrom, W. J. G. Endothelial Dysfunction in Erectile Dysfunction: Role of the Endothelium in Erectile Physiology and Disease. **Journal of Andrology**, 2013.

Bocchi, E. A.; Vilas-Boas, F.; Perrone, S.; Caamaño, A. G.; Clausell, N.; Moreira, Mda. C.; Thierer, J.; Grancelli, H. O.; Serrano Junior, C. V.; Albuquerque, D.; Almeida, D.; Bacal, F.; Moreira L. F.; Mendonza, A.; Magaña, A.; Tejeda, A.; Chafes, D.; Gomez, E.; Bogantes, E.; Azeka, E.; Mesquita, E. T.; Reis, F. J.; Mora, H.; Vilacorta, H.; Sanches, J.; Souza Neto, D.; Vuksovic, J. L.; Moreno, J. P.; Aspe y Rosas, J.; Moura, L. Z.; Campos, L. A.; Rohde, L. E.; Javier, M. P.; Garrido Garduño, M.; Tavares, M.; Castro Gálvez, P.; Spinoza, R.; Castro de Miranda, R.; Rocha, R. M.; Paganini, R.; Castano Guerra, R.; Rassi, S.; Lagudis, S.; Bordignon, S.; Navarette, S.; Fernandes, W.; Pereira Barretto, A. C.; Issa, V.; Guimarães, JI. **Arq Bras Cardiol.**; 85 Suppl 3:49-94; 1-48. 2005.

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

Brower, G. .; Janicki, J. S. Contribution of ventricular remodeling to pathogenesis of heart failure in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**; 280(2):H674-83., 2001.

Burnett, A. L.; Lowenstein, C. J.; Bredt, D. S.; Chang, T. S.; Snyder, S. H. Nitric oxide: A physiologic mediator of penile erection. **Science** 257:401–403, 1992

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

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

Castela, C. C.; Silvestre, A; Guardao, R.; Leite, L.; Vendeira, P. Reduced Levels Of Vascular Progenitor Cells And Diabetic Erectile Dysfunction: What's The Link?. **Journal Of Sexual Medicine** (Vol. 11, pp. 3-3), 2014.

Champion, H. C.; Bivalacqua, T. J.; Takimoto, E. K.; David A.; Burnett, A. L. Phosphodiesterase-5A dysregulation in penile erectile tissue is a mechanism of priapism, **PNAS**, vol. 102 no. 5, 1661–1666 2005.

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

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

De Groat, W.; Booth, A. Neural control of penile erection. **London: Hawoord**, pp. 465-513, 1993.

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.

Francis, S. H.; Busch, J.L; Corbin, J. D; Sibley, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol Rev.**;62 (3):525-63. doi: 10.1124/pr.110.002907. Review, 2010.

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, 405-11, 2004.

Giuliano F. Neurophysiology of erection and ejaculation. **J Sex Med.** Oct;8 Suppl 4:310-5. doi: 10.1111/j.1743-6109.2011.02450. Review, 2011.

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

Goldstein, A.; Meehan, J., Zakhary, R.; Buckley, P.; Rogers, F.. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. **Urology.**, (3):259-66, 1982.

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.

Heidenreich, P. A.; Trogon, J. G.; Khavjou, O. A.; Butler, J.; Dracup, K.; Ezekowitz, M. D.; Finkelstein, E. A.; Hong, Y.; Johnston, S. C.; Khera, A.; Lloyd-Jones, D. M.; Nelson, S. A.; Nichol, G.; Orenstein, D.; Wilson, P. W.; Woo, Y. J.; **Circulation.** 123(8):933-44, 2011.

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.

Hunt, S. A.; Abraham, W. T.; Chin, M. H.; et al.: ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines(Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. **Circulation**, 112:e154 – e235, 2005.

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.

Hurt ,K. J; Sezen, S.; Lagoda, F.; Gwen F.; Musicki B.; Rameau, G. A.; Snyderd, S. H.; Burnett, A. L.. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase mediates penile erection. **Proc Natl Acad Sci USA;** 109 (41) 16395 - 16396, 2012.

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

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

Jessap, M.; Suzan Brozena. Heart Failure. Review Article. **N. Engl. J. Med;** 348: 2007 – 18, 2003.

Jin, L.; Burnett, A. I. NADPH oxidase: recent evidence for its role in erectile dysfunction. **Asian J Androl.**, 10(1):6-13, 2008.

Keegan, A.; Cotter, M.; 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.

Khan, M.; Thompson, C.; Emsley, A.; Mumtaz, F.; Mikhailidis, D.; Angelini, G.; Morgan, J.; Jeremy, Jy. The interaction of homocysteine and copper markedly inhibits the relaxation of rabbit corpus cavernosum: new risk factors for angiopathic erectile dysfunction? **BJU Int.**, 84(6):720-4, 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.

Kojda, G.; Harrison, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovasc Res.**, 15;43(3):562-71, 1999.

Kostis, J. B.; Jackson, G.; Rosen, R.; Barrett-Connor, E.; Billups, K.; Burnett, A. L.; Carson, C. 3rd.; Cheitlin, M.; Debusk, R.; Fonseca, V.; Ganz, P.; Goldstein, I.; Guay, A.; Hatzichristou, D.; Hollander, J. E.; Hutter, A.; Katz, S.; Kloner, R. A.; Mittleman, M.; Montorsi, F.; Montorsi, P.; Nehra, A.; Sadovsky, R.; Shabsigh, R. Sexual dysfunction and cardiac risk (the Second Princeton Consensus Conference). **Am J Cardiol.**;96(12B):85M-93M. 2005 .

Krane, R. J.; Goldstein, I.; Saenz de Tejada, I. Impotence. **N Engl J Med.**, 1989.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, 15;227(5259):680-5, 1970.

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.

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.

Mangini, S., Silveira, F. S., Silva, C. P., Grativvol, P. S., Seguro, L. F., Ferreira, S. M.. Decompensated heart failure in the emergency department of a cardiology hospital. **Arq Bras Cardiol**, 90:400-6, 2009.

Mckenna, W.; Elliott, P. Hypertrophic cardiomyopathy. **Evid Based Cardiovasc Med.**, (4):89-91, 1998.

Mills, T.; Lewis, R.; Wingard, C.; Linder, A.; Jin L, Webb Rc. 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.

Murdoch, C.; Zhang, M.; Cave, A.; Shah, A. NADPH oxidase dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. **Cardiovasc Res.** 71(2):208-15, 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.

Packer, H. Pathophysiology of chronic heart failure. **Lancet.**, 340: 92 – 95, 1992

PARK, K.; SHIN, J.W.; OH, J.K.; RYU, K.S.; KIM, S.W.; PAICK, J.S. Restoration of erectile capacity in normotensive aged rats by modulation of angiotensin receptor type 1. **J. Androl.**, v. 26, p. 123–128, 2005.

Puech-Leao, P.; Reis, J.; Glina, S. & Reichelt, A.. Leakage through the crural edge of the corpus cavernosum: diagnosis and treatment. **Eur Urol.**, 13: 163-165, 1987.

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

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.

Sattar, A.; Wespes, E.; Schulman, C. Computerized measurement of penile elastic fibres in potent and impotent men. **Eur Urol.**, (2):142-4, 1994.

Sawyer, D.; Siwik, D.; Xiao, L.; Pimentel, D.; Singh, K.; Colucci, W. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. **J Mol Cell Cardiol.**, 34(4):379-88, 2002.

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.

Takimoto, E.; Kass, D. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. **Hypertension.**, 49(2):241-8, 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 nitrenergic nerve fibres. **Br J Pharmacol.**, 123(3): 435-42, 1998.

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

Trigo-Rocha, F. *et al.*. Nitric oxide and cGMP: Mediators of pelvic nerve-stimulated, 1993.

Trigo-Rocha, F. *et al.*. Sodium nitroprusside: Physiologic effects as a nitric oxide, 1995.

Walsh, P.; Brendler, C.; Chang, T.; Marshall, F.; Mostwin, J.; Stutzman, R.; Schlegel, P. Preservation of sexual function in men during radical pelvic surgery. **Md Med J.**, (4):389-93, 1990.

Yancy, C. W.; Jessup, M.; Bozkurt, B.; Butler, J.; Casey, D. E. Jr.; Drazner, M. H.; Fonarow, G. C.; Geraci, S. A.; Horwich, T.; Januzzi, J. L.; Johnson, M. R.; Kasper, E. K.; Levy, W.C.; Masoudi, F. A.; McBride, P. E.; McMurray, J. J.; Mitchell, J. E.; Peterson, P. N.; Riegel, B.; Sam, F.; Stevenson, L. W.; Tang, W. H.; Tsai, E. J.; Wilkoff, B. L.; ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association.; **J Am Coll Cardiol.**;62(16):e147-239, 2013.

8. ANEXO

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



**UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO**

Bragança Paulista, 25 de Abril de 2013

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Estudo morfofuncional e molecular da função erétil e do baixo trato urinário de ratos com insuficiência cardíaca crônica: Avaliação da via de sinalização NO-GCs-GMPc

ÁREA DE CONHECIMENTO: Saúde e Biológicas

Autor(es): Prof(a). Dr (a). Prof. Mario Angelo Claudino
Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.06.11

Prezado(a)s Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou na reunião do dia 25/04/2013 a resolução das pendências do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Alessandra Gambero

**Vice - Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa
Universidade São Francisco**

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Árs CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036