

**O INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE TIPO-9 (PDE9) BAY 73-6691 REDUZ A
HIPERCONTRATILIDADE DA MUSCULATURA LISA CAVERNOSA EM
RATOS COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA E POTENCIALIZA O EFEITO
DO TRATAMENTO CRÔNICO COM TADALAFIL**

Sabrina Cardoso Janussi¹, Sabrina Payne Tartarotti¹, Aline Gonçalves Mora¹, Douglas Rafael Andrade¹, James Pires Barbosa¹, Fernanda Bruschi Marinho Priviero¹, Mário Angelo Claudino¹.

¹ Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil.

Autor correspondente: Sabrina Cardoso Janussi

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa – Setor de
Farmacologia Cardiovascular

Endereço: Avenida São Francisco de Assis, 218 – Cidade
Universitária

Bragança Paulista, São Paulo, Brasil

CEP: 12916-900

E-mail: s.aa.h@hotmail.com

Resumo

Dados apontam forte associação da insuficiência cardíaca (IC) e a disfunção erétil (DE). A DE é tratada com inibidores da fosfodiesterase-5, porém, estes apresentam efeitos benéficos moderados. No presente estudo investigamos o papel *in vitro* do inibidor da fosfodiesterase-9 (BAY 73-6691) na regulação do mecanismo contrátil do corpo cavernoso (CC) de ratos com IC tratados com Tadalafil. Ratos machos Sprague-Dawley foram submetidos ao modelo de fístula aortocaval para indução da IC, divididos em 4 grupos para o tratamento: Sham e IC (salina 0,9%) e Tadalafil e IC Tadalafil (Tadalafil 5mg/dia), e submetidos à ecocardiografia transtorácica pré e pós-tratamento. A contratilidade do CC foi avaliada em resposta a fenilefrina (PE; 10nM-100µM) e a estimulação elétrica (EFS; 1-32Hz) na presença e ausência do BAY 73-6691. Observou-se aumento da massa do VE e diminuição da fração de ejeção no grupo IC comparado ao grupo Sham ($P<0,05$), porém, no grupo IC Tadalafil, o tratamento restaurou as alterações ($P<0,05$). Na avaliação dos mecanismos contráteis do CC, ambas foram aumentadas no grupo IC comparado ao grupo Sham ($P<0,05$). Entretanto, o tratamento com Tadalafil restaurou a hipercontratilidade no grupo IC Tadalafil ($P<0,05$). Além disso, a adição “*in vitro*” do BAY 73-6691 reduziu a hipercontratilidade cavernosa em todos os grupos analisados, com redução acentuada nos animais IC (66% $P<0,05$) e efeito aditivo nos animais IC Tadalafil (48% $P<0,05$). Assim, o BAY 73-6691 promoveu redução da hipercontratilidade cavernosa dos animais IC e mostrou possuir um efeito aditivo na redução do mecanismo contrátil cavernoso dos animais tratados previamente com Tadalafil.

Palavras chave: Insuficiência Cardíaca; Disfunção Erétil; Inibidor da fosfodiesterase-9.

Abstract

Data show a strong association between heart failure (HF) and erectile dysfunction (ED). ED is treated with phosphodiesterase-5 inhibitors, but these have moderate beneficial effects. In the present study we investigated the in vitro role of the phosphodiesterase-9 inhibitor (BAY 73-6691) in regulating the contractile mechanism of the corpus cavernosum (CC) of rats with HF treated with Tadalafil. Male Sprague-Dawley rats were submitted to the aortocaval fistula model for induction of HF, divided into 4 groups for the treatment: Sham and HF (saline 0.9%) and Tadalafil and HF Tadalafil (Tadalafil 5mg /day), and submitted transthoracic echocardiography before and after treatment. The contractility of the CC was evaluated in response to phenylephrine (PE; 10nM-100µM) and electrical field stimulation (EFS; 1-32Hz) in the presence and absence of BAY 73-6691. There was an increase in LV mass and a decrease in ejection fraction in the HF group compared to the Sham group ($P < 0.05$), but in the HF Tadalafil group, the treatment restored the changes ($P < 0.05$). In the evaluation of contractile mechanisms of CC, both were increased in the HF group compared to the Sham group ($P < 0.05$). However, treatment with Tadalafil restored hypercontractility in the HF Tadalafil group ($P < 0.05$). In addition, the in vitro addition of BAY 73-6691 reduced cavernous hypercontractility in all analyzed groups, with marked reduction in HF animals (66% $P < 0.05$) and additive effect in the animals HF Tadalafil (48% $P < 0.05$). Thus, BAY 73-6691 promoted reduction of cavernous hypercontractility of HF animals and showed to have an additive effect in reducing the cavernous contractile mechanism of animals previously treated with Tadalafil.

Keywords: Heart Failure; Erectile Dysfunction; Phosphodiesterase-9 Inhibitor.

Introdução

A disfunção erétil (DE) é denominada como a incapacidade de alcançar ou manter ereção peniana apropriada para a satisfação sexual e está associada a um significativo declínio na qualidade de vida dos homens (Johannes *et al.*, 2000). A Organização Mundial de Saúde (OMS) indica que 30% da população economicamente ativa apresenta algum tipo de DE o que, no Brasil, reflete cerca de 11 a 15 milhões de homens. A DE possui graus e fatores variáveis, que podem se originar de forma neurogênica, orgânica ou da associação de ambas. Entretanto, as causas mais comuns de DE são as de origem orgânica vasculogênica (Agarwal, 2006). Sabe-se que na DE vasculogênica, a deficiência de óxido nítrico (NO) e alterações em importantes vias de sinalização têm sido destacadas como as principais causas no desenvolvimento da DE associada a doenças cardiovasculares como a insuficiência cardíaca (IC) (Apostolo *et al.*, 2009; Fung *et al.*, 2004).

Dados da *American Heart Association* (AHA) determinam que no período de 2007 a 2012 cerca de 5,1 milhões de indivíduos nos Estados Unidos apresentaram IC (Heidenreich *et al.*, 2013). As projeções indicam que os casos aumentem em aproximadamente 46% de 2012 a 2030, resultando em mais de 8 milhões de pessoas com IC (GO, 2014). No Brasil, segundo o DATASUS, apenas no ano de 2012 houveram 26.694 óbitos e 238.890 casos de hospitalização por IC, gerando altos custos para o Sistema Público de Saúde (Albuquerque *et al.*, 2015). Sabe-se que a insuficiência cardíaca é o processo final de várias doenças cardiovasculares, como miocardites, hipertensão arterial e doença arterial coronariana (Abassi *et al.*, 2010).

Apesar de ser associada como o desfecho final no processo de complicações cardiovasculares, a IC não é mais considerada uma doença cardíaca isolada, pois envolve múltiplos sistemas e mecanismos compensatórios neuro-humorais,

acompanhada de altos índices de morbidade e mortalidade (Crimi *et al.*, 2009), sendo caracterizada por uma disfunção cardíaca e/ou anormalidade estrutural miocárdica, onde o coração é incapaz de ejetar sangue suficiente para suprir as necessidades metabólicas dos tecidos e sistemas (Yancy, 2013). Diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma forte associação entre IC e DE, com prevalência de 58% a 85%, que está diretamente relacionada à gravidade e ao período da IC (Apostolo *et al.*, 2009). Aproximadamente 75% dos pacientes com IC relatam comprometimento da libido (Jaarsma *et al.*, 1996) e 30% apresentam ausência completa de atividades sexuais (Westlake *et al.*, 1999).

Vários trabalhos demonstram que o óxido nítrico (NO) é o componente central de um importante sistema de transdução de sinais que atua no pênis para mediar a resposta erétil (Andersson & Wagner, 1995; Lue, 2000). O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é encontrada nos nervos nitrérgicos (nNOS) e células endoteliais (eNOS) do corpo cavernoso. 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. 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 cavernosa e, conseqüentemente, ereção peniana. O GMPc é hidrolisado a GMP pela ação das fosfodiesterases, cessando assim a resposta erétil (Lucas *et al.*, 2000).

Sabe-se que a fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) foi a primeira enzima seletiva cíclica-GMP descoberta a desempenhar um papel importante no controle da função

erétil (Boolel *et al.*, 1996), e, através de cromatografia de troca iônica em extratos penianos, evidenciou-se que a PDE5 é a isoforma predominante no corpo cavernoso (Gopal *et al.*, 2001). Demonstrou-se que o inibidor seletivo de PDE5, Sildenafil, causa elevação dos níveis de GMPc intracelular, e potencializa o relaxamento de corpo cavernoso mediado pelo NO *in vitro*, além de aumentar o grau de ereção peniana *in vivo* (Aydin *et al.*, 2001). Além da PDE5, outras isoformas de PDEs atuam na hidrólise do GMPc, com destaque para a fosfodiesterase-9 (PDE9) que apresenta maior afinidade pelo GMPc dentre todas as PDEs (Omori & Kotera, 2007). Atualmente, sabe-se que a PDE9A é expressa no intestino, rim, cérebro, coração de humanos (Lee *et al.*, 2015) e no corpo cavernoso de camundongos (Da Silva *et al.*, 2013).

O composto BAY 73-6691 é um potente inibidor de PDE9, com IC₅₀ de 55nM. O mesmo composto apresenta IC₅₀ muito superior a 4000nM para inibir PDE5A (Wunder *et al.*, 2005). A inibição farmacológica da PDE9, utilizando o PF-04449613, promoveu uma proteção contra as respostas patológicas neuro-hormonais e ao estresse de pressão-sobrecarga sustentada (características da hipertrofia e IC). Curiosamente, o efeito da inibição da PDE9 foi independente da atividade de sintetase de NO (Lee *et al.*, 2015). Efeitos semelhantes foram observados em camundongos nocautes para a PDE9 (Lee *et al.*, 2015).

Desta forma, uma vez que existe uma correlação positiva no desenvolvimento da disfunção erétil associado à IC, o inibidor da PDE9, BAY 73-6691, pode ser uma nova estratégia terapêutica para os distúrbios sexuais e cardiovasculares. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar o papel da fosfodiesterase tipo-9 na regulação da contratilidade da musculatura lisa cavernosa de ratos com insuficiência cardíaca previamente tratados com Tadalafil, utilizando-se o composto BAY 73-6691 como ferramenta farmacológica para inibição de PDE9.

Materiais Métodos

Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Sprague Dawley (250-300g), fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos à 24°C em ciclos de claro/escuro (12/12h), 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).

Indução da insuficiência cardíaca: Modelo de fístula aortocava

Os ratos foram previamente anestesiados com ketamina (62 mg/kg) e xilazina (7mg/kg) administrado por via intraperitoneal (IP). Os animais 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 16G e bisel curto, avanço de 1cm 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 cianoacrilato, 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. (Gardner *et al.*, 2009).

Ecocardiograma transtorácico

Para a validação do desenvolvimento da IC os animais foram submetidos ao exame de ecocardiografia transtorácica nas fases pré-tratamento (8 semanas). Os animais foram anestesiados com xilazina (7mg/kg) e ketamina (62mg/kg) administradas via intraperitoneal, posteriormente foi realizada a tricotomia da região torácica e os animais foram submetidos ao procedimento de ecocardiografia. Para a Ecocardiografia Transtorácica foi utilizado o equipamento (Sono Site – M Turbo, Washington, USA). Os parâmetros mensurados foram massa do VE e fração de ejeção (Rodrigues *et al.*, 2016). Uma vez definido o desenvolvimento da IC, os animais foram divididos em dois grupos experimentais:

- Sham: os animais deste grupo sofreram intervenção cirúrgica, foram submetidos ao processo de cessamento de fluxo nos vasos, porém sem a criação da fístula aortocava;
- Insuficiência cardíaca (IC): os animais deste grupo foram submetidos ao procedimento cirúrgico com indução da fístula aortocava.

Em seguida, iniciou-se o tratamento crônico com o inibidor da PDE5, Tadalafil.

Tratamento crônico com Tadalafil

Após 8 semanas da indução da fístula, o tratamento crônico com o Tadalafil foi iniciado e aplicado por 4 semanas, totalizando 12 semanas de protocolo experimental (Choi *et al.*, 2015; Salloum *et al.*, 2014; Gacci *et al.*, 2016). O tratamento crônico com o inibidor da PDE5, Tadalafil, utilizado como um agente vasodilatador dependente de NO, foi realizado por via intraperitoneal, sendo administrada a dose de 5mg/rato/dia. Assim, o Tadalafil foi diluído em solução de NaCl 0,9% e a solução homogeneizada 3 minutos no agitador de tubos tipo Vortex. Os animais controle (Sham) foram submetidos às mesmas

condições experimentais, porém receberam apenas a solução NaCl 0,9%. Nesta etapa, os animais foram subdivididos em quatro grupos experimentais:

- Sham: os animais deste grupo receberam somente solução de NaCl 0,9%;
- IC: os animais deste grupo receberam somente solução de NaCl 0,9%;
- Tadalafil: os animais deste grupo receberam Tadalafil na dose de 5mg/rato/dia;
- IC + Tadalafil: os animais deste grupo receberam Tadalafil na dose de 5mg/rato/dia.

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

Inicialmente, 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; MgSO₄7H₂O, 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, seguida de secção do septo fibroso que os conecta. Desta forma, dois segmentos de corpo cavernoso foram obtidos de cada animal, com peso aproximado de 0,250g cada segmento. Os tecidos foram montados em miógrafos (5mL) preenchidos com a solução Krebs-Henseleit, continuamente aerado com O₂:CO₂ (95:5%), mantidos à temperatura de 37°C e aplicada tensão de 5mN ajustada periodicamente até o período de estabilização (60min).

Para a avaliação dos mecanismos contráteis, foram construídas curvas dependentes da concentração à fenilefrina (10nM – 100μM), que é um agonista de receptores α₁-adrenérgicos na presença e ausência do BAY 73-6691 (10μM; pré-incubado por 30min), em tecido com tônus basal.

Bem como curvas frequência – resposta à estimulação elétrica de campo nos nervos autonômicos (EFS) na presença e ausência do BAY 73- 6691 (10 μ M; pré-incubado por 30min), em tecido com tônus basal, montados entre 2 eletrodos de platina. Os tecidos foram estimulados eletricamente a uma voltagem de 50V, em pulsos de 1 milissegundo, com intervalos de 0,2ms, duração da estimulação de 10 segundos nas frequências 1, 2, 4, 8, 16 e 32Hz, com intervalo de 3 minutos entre os estímulos (Claudino *et al.*, 2009). A estimulação elétrica foi realizada através de estimulador elétrico DMT (Current stimulator CS200, Ann Arbor, MI, EUA).

As respostas contráteis foram expressas em mN/mg de peso úmido do tecido. Os gráficos foram elaborados e analisados através do programa computacional “GraphPad PRISM” (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Análise estatística

Valores experimentais de contração foram calculados em relação à contração máxima produzida pelo agonista dividido pelo peso úmido de cada strip (mN.mg⁻¹). Valores de EC50 foram apresentados como o logaritmo negativo (pEC50), calculados pelo programa GraphPad Prism. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.) do número (n) de experimentos indicados em cada caso. Para comparações múltiplas de variáveis independentes foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo *post hoc* teste de Tukey. O teste t não pareado de *Student* foi utilizado para as análises estatísticas dos dados de ecocardiograma nos grupos pré-tratamento. O programa InStat (GraphPad, version 3,00 Software, EUA) foi usado para as análises. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Modelo de FAC resulta em disfunção cardíaca e tratamento crônico com Tadalafil reverte os parâmetros cardíacos

O controle dos parâmetros cardíacos foi realizado através de ecocardiograma transtorácico, sendo mensuradas a massa do ventrículo esquerdo (VE) e fração de ejeção em animais pré e pós-tratamento crônico com Tadalafil. No grupo IC pré-tratamento observou-se aumento da massa do VE (43%) e diminuição da fração de ejeção (13%) quando comparado ao respectivo grupo Sham ($P<0,01$). Assim, comprovando que o modelo de fístula aortocaval foi eficiente na indução da IC. Uma vez estabelecida a IC, iniciou-se o tratamento crônico com Tadalafil 5mg/dia por 4 semanas. Após o tratamento observou-se a restauração e a reversão dos parâmetros cardíacos pré-avaliados, com diminuição da massa do VE (23%) e aumento da fração de ejeção (16%) no grupo IC Tadalafil quando comparado ao grupo IC pós-tratamento ($P<0,05$). O tratamento com Tadalafil não alterou os parâmetros cardíacos no grupo Tadalafil. (Figura 01).

Tadalafil reverte a hipercontratilidade do músculo liso cavernoso

A resposta contrátil do corpo cavernoso foi avaliada através da construção de curvas frequência-resposta (EFS; 1-32 Hz) e concentração-resposta ao agonista de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, fenilefrina (PE; 10nM-100 μ M), no músculo liso cavernoso de ratos tratados com Tadalafil cronicamente. Foi possível observar que o grupo IC apresentou uma hipercontratilidade significativa tanto na contração neurogênica como na adrenérgica quando comparado ao grupo Sham ($P<0,05$). Porém, no grupo IC Tadalafil observou-se que a hipercontratilidade neurogênica foi significativamente reduzida quando comparado ao grupo IC ($P<0,05$) (Figura 02).

BAY 73-6691 reduz a hipercontratibilidade do músculo liso cavernoso

A resposta contrátil do corpo cavernoso foi avaliada através da construção de curvas concentração-resposta ao agonista de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, fenilefrina (PE; 10nM-100 μ M), no músculo liso cavernoso em tônus basal na presença e ausência do BAY 73-6691. Foi possível observar que o grupo IC apresentou uma hipercontratibilidade significativa quando comparado ao grupo Sham ($P<0,05$). Todavia, na presença do inibidor de PDE9, BAY 73-6691, observou-se que a hipercontratibilidade apresentada no grupo IC foi significativamente reduzida quando comparado ao grupo IC + BAY 73-6691 ($P<0,05$). Ainda, o grupo Sham + BAY 73-6691 apresentou atividade contrátil significativamente diminuída quando comparado ao grupo Sham ($P<0,05$) (Figura 03).

Além disso, a resposta contrátil do músculo liso cavernoso induzida pela estimulação elétrica foi avaliada através da construção de curvas frequência-resposta a EFS em tônus basal, na presença e ausência do BAY 73-6691. Ao analisarmos o grupo IC, observamos que há uma hipercontratibilidade significativa quando comparado ao grupo Sham nas frequências de 2, 4, 8, 16 e 32 Hz ($P<0,05$ nas frequências de 2, 4, 8 e 16 e $P<0,01$ em 32Hz). Porém, na presença do inibidor de PDE9 a hipercontratibilidade neurogênica foi reduzida significativamente quando comparado ao grupo IC + BAY 73-6691 ($P<0,05$) (Figura 03).

BAY 73-6691 *in vitro* promove efeito aditivo com o tratamento com Tadalafil na contratilidade do músculo liso cavernoso restaurando a hipercontratibilidade

A resposta contrátil do corpo cavernoso foi avaliada através da construção de curvas frequência-resposta (1-32 Hz) e concentração-resposta ao agonista de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, fenilefrina (PE; 10nM-100 μ M), na presença e ausência do BAY 73-6691 no músculo liso cavernoso do grupo IC + Tadalafil. Observou-se um possível efeito

aditivo entre os mecanismos envolvendo a inibição da PDE5, com redução extremamente significativa da hipercontratilidade nos corpos cavernosos mediados à PE ($P<0,001$) e ao EFS nas frequências de 2, 4, 8, 16 e 32 Hz ($P<0,05$ na frequência de 2 Hz e $P<0,01$ nas frequências de 4, 8, 16 e 32Hz) (Figura 4).

Discussão

Neste estudo, investigamos a contribuição do inibidor de PDE9, BAY 73-6691, no comprometimento da musculatura lisa cavernosa de ratos com IC, submetidos ao modelo de fístula aortocaval (FAC) e tratados cronicamente com Tadalafil. Nossos dados demonstram que as alterações hemodinâmicas promovidas pela sobrecarga de volume resultante da FAC induziram hipertrofia cardíaca e redução da função do VE, além de hipercontratilidade do tecido muscular cavernoso. No entanto, foi demonstrado que após tratamento crônico com Tadalafil os parâmetros cardíacos e cavernosos foram restaurados, e, além disso, na presença *in vitro* do BAY 73-6691 a hipercontratilidade cavernosa foi diminuída e o mesmo demonstrou possuir um efeito aditivo ao Tadalafil, quando associados.

Sabe-se que a disfunção erétil (DE) e a insuficiência cardíaca (IC) apresentam fatores de risco em comum, como hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes, os quais estão associados à disfunção do sistema nervoso autônomo, alterações de importantes vias de sinalização que controlam o tônus muscular liso, estresse oxidativo e redução da disponibilidade de óxido nítrico (NO) (Jeremy *et al.*, 2007). Porém, apesar da alta prevalência e da forte associação entre os quadros, os mecanismos envolvidos ainda não estão claramente estabelecidos.

O NO é reconhecidamente uma molécula com múltiplos efeitos regulatórios no miocárdio e tecido vascular, assim como em inúmeros outros órgãos e tecidos do organismo. Em miocárdio de mamíferos o NO é responsável por aumentar a complacência do VE, atenuar a resposta beta adrenérgica e potencializar respostas parassimpáticas, além de alterar os níveis intracelulares de cálcio, impactando o desempenho cardíaco sistólico e diastólico (Simon *et al.*, 2014). Sabe-se que em pacientes com IC a sinalização deficiente do NO está relacionada com aumento da

produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's), remodelamento cardíaco e anormalidades diastólicas no ventrículo esquerdo (VE) (Bhardwaj *et al.*, 2013; Langrish *et al.*, 2013).

Em modelo experimental de sobrecarga cardíaca por alterações de pressão, observou-se aumento dos níveis de PDE5 no miocárdio, onde a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi capaz de atenuar o aumento da PDE5, protegendo contra a hipertrofia do VE e insuficiência cardíaca congestiva, sugerindo que o estresse oxidativo aumenta a expressão de PDE5, que atua na modulação da hipertrofia dos cardiomiócitos (Pokreisz *et al.*, 2009). Resultados semelhantes foram relatados no estudo de Vandenwijngaert e colaboradores (2013), onde se observou aumento da expressão de PDE5 no VE de pacientes com cardiopatia dilatada e isquêmica, associada à hipertrofia do VE, capacidade contrátil dos cardiomiócitos diminuída e disfunção sistólica e diastólica do VE.

Os dados obtidos em nosso laboratório corroboram com os achados da literatura, pois 8 semanas após a indução da IC os animais apresentaram hipertrofia de VE e diminuição da fração de ejeção. Porém, o tratamento com Tadalafil foi capaz de restaurar as alterações cardíacas hipertróficas e a funcionalidade do VE, comprovando o efeito cardioprotetor da inibição da PDE5 no miocárdio. Pesquisas recentes sugerem que a redução da hipertrofia e melhora na função do VE não está apenas ligada aos efeitos vasculares promovidos pelos inibidores de PDE5. De acordo com Munjal e colaboradores (2014) foi proposto que o tratamento com Tadalafil foi capaz de atenuar a ação do TGF- β no músculo cardíaco após a administração de angiotensina II, promovendo um efeito protetor contra o aumento da deposição de colágeno e aumento da fibrose cardíaca.

Apesar do efeito benéfico conhecido dos inibidores de PDE5 na resposta erétil, sabe-se que em certos casos de DE não é possível observar uma resposta benéfica

completamente satisfatória no uso dos mesmos, principalmente em casos de disfunção endotelial ou neuropatias que afetam a função erétil.

Estudos apontam que um total de 13 genes de PDE são expressos em corpo cavernoso e artéria cavernosa (Nies *et al.*, 2002; Waldkirch *et al.*, 2005). E sabe-se que além da PDE5 outras isoformas de PDEs atuam na hidrólise do GMPc, dentre elas a PDE9 foi descrita como a que apresenta maior afinidade pelo GMPc (Omori & Kotera, 2007).

Por ser uma enzima relativamente descoberta recentemente, não existe uma vasta gama de informações na literatura, porém estudos recentes apontam a expressão da PDE9A no intestino, rim, cérebro, coração de humanos (Lee *et al.*, 2015; Soderling *et al.*, 1998) e no corpo cavernoso de camundongos (Da Silva *et al.*, 2013). O que vem trazendo estudos dos inibidores de PDE9 para benefício em diversas patologias, como em doenças do Sistema Nervoso Central, Doença de Alzheimer (Claffey *et al.*, 2012; Van Der Staay *et al.*, 2008), onde através do inibidor seletivo de PDE9, BAY 73-6691, foi possível obter melhora da aprendizagem e memória em ratos (Van Der Staay *et al.*, 2008), Diabetes mellitus, onde Shao e colaboradores (2014) caracterizaram um novo inibidor seletivo de PDE9 como potencial agente hipoglicemiante, e foi demonstrado que, tanto a hipertrofia cardíaca como a insuficiência cardíaca em humanos, levam a uma regulação positiva da expressão da PDE9A, o que nessas condições patológicas, o papel principal dessa enzima é regular os níveis dos peptídeos natriuréticos nos miócitos e músculo cardíaco e não apenas a hidrólise dos níveis de GMPc estimulado pelo NO (Lee *et al.*, 2015).

Entretanto, estudos sobre o papel da fosfodiesterase tipo 9 na regulação da musculatura lisa cavernosa na disfunção erétil são poucos explorados até o momento. Visto que o entendimento dessa questão se faz muito importante já que existem pacientes que não respondem de forma eficaz ao tratamento com os inibidores de PDE5, se faz necessário estudos no âmbito da caracterização dos efeitos do inibidor seletivo de PDE9 BAY 73-6691 em modelos de função erétil *in vitro*, podendo representar grande avanço no que diz respeito a terapias farmacológicas para o tratamento da disfunção erétil.

Da Silva e colaboradores (2013) através de um tratamento por gavagem diária durante 21 dias com o inibidor de PDE9, BAY 73-6691, evidenciou que o bloqueio

crônico da atividade da PDE9 promoveu uma amplificação da resposta relaxante da musculatura lisa cavernosa mediada pela via de sinalização NO-cGMP.

Os dados obtidos em nosso laboratório corroboram com os descritos na literatura, pois após adição *in vitro* do inibidor da fosfodiesterase 9, BAY 73-6691, no tecido cavernoso de ratos com insuficiência cardíaca, apresentando hipercontratilidade da musculatura lisa cavernosa, pôde-se notar que tanto a resposta contrátil à PE como a contração neurogênica foram significativamente reduzidas. Apontando então, que após inibição da enzima PDE9, toda a cascata para que haja a regulação da função erétil foi restaurada. Além disso, quando associado ao tratamento crônico com Tadalafil, o inibidor seletivo de PDE9, BAY 73-6691, mostrou possuir um efeito aditivo na regulação da contratilidade cavernosa. Assim, indicando o BAY 73-6691 como um possível veículo de tratamento para pacientes que sofrem de disfunção erétil.

Desta forma, o Tadalafil comprova seu efeito cardioprotetor ao restaurar as alterações cardíacas hipertróficas e a função do VE. Na função erétil o tratamento crônico foi capaz de diminuir a hipercontratilidade da musculatura lisa cavernosa relacionada á DE mostrando-se uma opção terapêutica eficaz e com benefícios significativos nas alterações cardíacas e cavernosas de ratos com IC e o inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 9, BAY 73-6691, *in vitro* promove efeito aditivo na redução do mecanismo contrátil cavernoso associado ao tratamento crônico com Tadalafil e restaura a hipercontratilidade cavernosa de ratos, decorrentes do comprometimento hemodinâmico e neuro-humoral gerado pela IC.

Referências

- 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. **BioMed Research International**, v. 9, 2010.
- AGARWAL, A. Role of Oxidative Stress in the Pathophysiological Mechanism of Erectile Dysfunction. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 3, p. 335-347, 2006.
- ALBUQUERQUE, D.C., SOUZA NETO, J.D., BACAL, F. I registro brasileiro de insuficiência cardíaca—aspectos clínicos, qualidade assistencial e desfechos hospitalares. **Arq Bras Cardiol**, v. 104, n. 6, p. 433-42, 2015.
- ANDERSSON, K., WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiological reviews**, v. 75, n. 1, p. 191-236, 1995.
- APOSTOLO, A., VIGNATI, C. Original research—erectile dysfunction: Erectile Dysfunction in Heart Failure: Correlation with Severity, Exercise Performance, Comorbidities, and Heart Failure Treatment. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 10, p. 2795-2805, 2009.
- AYDIN, SABAHATTIN, ÖZBEK, HANEFİYILMAZ, YÜKSEL *et al.* Effects of sildenafil citrate, acetylcholine, and sodium nitroprusside on the relaxation of rabbit cavernosal tissue in vitro. **Urology**, v. 58, n. 1, p. 119-124, 2001.
- BHARDWAJ, A.; KAUR, J.; KNAUS, E. Can nitric oxide-releasing hybrid drugs alleviate adverse cardiovascular risks?. **Future medicinal chemistry**, v. 5, no. 4, p. 381-383, 2013.
- BOOLELL, M., ALLEN, M.J., BALLARD, S.A., GEPI-ATTEE, S. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific fosfodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **International journal of impotence research**, v. 8, n. 2, p. 47-52, 1996.
- CHOI, H.; KIM, J. H.; SHIM, J. S.; PARK, J. Y.; KANG, S. H.; MOON, D. G.; BAE, J. H. Comparison of the efficacy and safety of 5-mg once-daily versus 5-mg alternate-day tadalafil in men with erectile dysfunction and lower urinary tract symptoms. **International journal of impotence research**, v. 27, no. 1, pp. 33-37, 2015.
- CLAUDINO, M. A. *et al.* Increased cavernosal relaxations in sickle cell mice priapism are associated with alterations in the NO-cGMP signaling pathway. **The journal of sexual medicine**, v. 6, n. 8, p. 2187-2196, 2009.
- CLAFFEY, M. M. *et al.* Application of structure-based drug design and parallel chemistry to identify selective, brain penetrant, in vivo active phosphodiesterase 9A inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 21, p. 9055-9068, 2012.
- CRIMI, ETTORE, IGNARRO, LOUIS J. CACCIATORE, FRANCESCO *et al.* Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, n. 4, p. 292-300, 2009.
- DA SILVA, F H, PEREIRA, M NFRANCO-PENTEADO, C F *et al.* Phosphodiesterase-9 (PDE9) inhibition with BAY 73-6691 increases corpus cavernosum relaxations mediated by

nitric oxide–cyclic GMP pathway in mice. **International Journal of Impotence Research**, v. 25, n. 2, p. 69-73, 2013.

FUNG, M. M., BETTENCOURT, R., BARRETT-CONNOR, E. Heart disease risk factors predict erectile dysfunction 25 years later: the Rancho Bernardo Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 43, n. 8, p. 405-411, 2004.

GACCI, M.; ANDERSSON, K. E.; CHAPPLE, C.; MAGGI, M.; MIRONE, V.; OELKE, M.; GIULIANO, F. Latest evidence on the use of phosphodiesterase type 5 inhibitors for the treatment of lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. **European urology**, v. 70, no. 1, pp. 124-133, 2016.

GARDNER, J., MURRAY, D., VOLOSHENYUK, T., BROWER, G., BRADLEY, J., JANICKI, J. Estrogen attenuates chronic volume overload induced structural and functional remodeling in male rat hearts. **AJP: Heart and Circulatory Physiology** 298, H497-H504, 2009.

GO, A. S. Heart disease and stroke statistics-2014 update. **Circulation**, v. 129, n. 3, 2014.

GOPAL, V. K., FRANCIS, S. H., CORBIN, J. D. Allosteric sites of phosphodiesterase-5 (PDE5). A potential role in negative feedback regulation of cGMP signaling in corpus cavernosum. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 11, p. 3304- 3312, 2001.

HEIDENREICH, P. A., ALBERT, N. M., ALLEN, L. A. *et al.* Forecasting the Impact of Heart Failure in the United States: A Policy Statement From the American Heart Association. **Circulation: Heart Failure**, v. 6, n. 3, p. 606-619, 2013.

JAARSMA, T., DRACUP, K., WALDEN, J., STEVENSON, L.W. Sexual function in patients with advanced heart failure. **Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care**, v. 25, n. 4, p. 262-270, 1996.

JEREMY, J. Y. *et al.* Reactive oxygen species and erectile dysfunction: possible role of NADPH oxidase. **International journal of impotence research**, v. 19, n. 3, p. 265-280, 2007.

JOHANNES, CATHERINE B., ARAUJO, ANDRE B., FELDMAN, HENRY A. *et al.* incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the massachusetts male aging study. **The Journal of Urology**, v. 163, n. 2, p. 460-463, 2000.

LANGRISH, J. P.; UNOSSON, J.; BOSSON, J.; BARATH, S.; MUALA, A.; BLACKWELL, S.; SANDSTRÖM, T. Altered nitric oxide bioavailability contributes to diesel exhaust inhalation-induced cardiovascular dysfunction in man. **Journal of the American Heart Association**, v. 2, no. 1, 2013.

LEE, DONG I., ZHU, GUANGSHUO, SASAKI, TAKASHI *et al.* Phosphodiesterase 9A controls nitric-oxide-independent cGMP and hypertrophic heart disease. **Nature**, v. 519, n. 7544, p. 472-476, 2015.

LUCAS, K. A. *et al.* Guanil-ciclases e sinalização por GMP cíclico. **Avaliações farmacológicas**, v. 52, n. 3, p. 375-414, 2000.

LUE, T. F. Erectile dysfunction. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 24, p. 1802-1813, 2000.

- MUNJAL, C.; OPOKA, A. M.; OSINSKA, H.; JAMES, J. F.; BRESSAN, G. M.; HINTON, R. B. TGF- β mediates early angiogenesis and latent fibrosis in an Emilin1-deficient mouse model of aortic valve disease. **Dis Model Mech**, v. 7, pp. 987–96, 2014.
- NIES, A. T. *et al.* Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system. **The Journal of urology**, v. 167, n. 5, p. 2271-2275, 2002.
- OMORI, K., KOTERA, J. Overview of PDEs and their regulation. **Circulation research**, v. 100, n. 3, p. 309-327, 2007.
- POKREISZ, P.; VANDENWIJNGAERT, S.; BITO, V.; VAN DEN BERGH, A.; LENAERTS, I.; BUSCH, C.; LIU, X. Ventricular phosphodiesterase-5 expression is increased in patients with advanced heart failure and contributes to adverse ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. **Circulation**, v. 119, no. 3, pp. 408-416, 2009.
- RODRIGUES, F., LOPES, R., FAIS, R., DE OLIVEIRA, L., PRADO, C., TOSTES, R., CARNEIRO, F. Erectile dysfunction in heart failure rats is associated with increased neurogenic contractions in cavernous tissue and internal pudendal artery. **Life Sciences** 145, 9-18, 2016.
- SALLOUM, F. N.; CHAU, V. Q.; HOKE, N. N.; KUKREJA, R. C. Tadalafil prevents acute heart failure with reduced ejection fraction in mice. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 28, no. 6, pp. 493-500, 2014.
- SHAO, Y. *et al.* Discovery of a phosphodiesterase 9A inhibitor as a potential hypoglycemic agent. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 24, p. 10304-10313, 2014.
- SIMON, J. N.; DUGLAN, D.; CASADEI, B.; CARNICER, R. Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation–contraction coupling in health and disease. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 73, pp. 80-91, 2014.
- SODERLING, S. H.; BAYUGA, S. J.; BEAVO, J. A. Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15553-15558, 1998.
- VANDENWIJNGAERT, S.; POKREISZ, P.; HERMANS, H.; GILLIJNS, H.; PELLENS, M.; BAX, N. A.; BOUTEN, C. V. Increased cardiac myocyte pde5 levels in human and murine pressure overload hypertrophy contribute to adverse lv remodeling. **Plos One**, v. 8, no. 3, pp. E58841, 2013.
- VAN DER STAAY, F. J. *et al.* The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 5, p. 908-918, 2008.
- WALDKIRCH, E. *et al.* Cyclic AMP-specific and cyclic GMP-specific phosphodiesterase isoenzymes in human cavernous arteries—immunohistochemical distribution and functional significance. **World journal of urology**, v. 23, n. 6, p. 405-410, 2005.
- WESTLAKE, CHERYL, DRACUP, KATHLEENWALDEN, JULIE A *et al.* Sexuality of patients with advanced heart failure and their spouses or partners. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 18, n. 11, p. 1133-1138, 1999.

WUNDER, F., TERSTEEGEN, A., REBMANN, A., ERB, C., FAHRIG, T., HENDRIX, M. Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line. **Molecular pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 1775-1781, 2005.

YANCY, C. W. ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 16, p. e147-e239, 2013.

Legendas das Imagens

Figura 01. Análise da função cardíaca. Parâmetros cardíacos dos animais Sham (n=8) e IC (n=7) avaliados pré-tratamento (8 semanas após realização da fístula aortocaval) e Sham (n=8), IC (n=7), Tadalafil (n=9) e IC Tadalafil (n=7), avaliados após tratamento com Tadalafil (12 semanas após a indução da fístula aortocaval). O painel A mostra os valores médios da massa ventricular esquerda, e o painel B mostra a fração de ejeção. Os dados foram expressos como Média $\pm$ E.P.M para n experimentos. ****** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo Sham; **#** $P < 0,01$ comparado ao grupo IC pós-tratamento.

Figura 02. Efeito do Tadalafil na avaliação contrátil da musculatura lisa cavernosa de ratos com IC. Curvas concentração-resposta para avaliação contrátil da musculatura lisa cavernosa para fenilefrina (PE 10nM-100 μ M) e estimulação elétrica (EFS 1-32Hz) após tratamento crônico com Tadalafil dos grupos Sham (n=6), IC (n=6), Tadalafil (n=7) e IC Tadalafil (n=8). Os dados foram expressos como Média $\pm$ E.P.M para n experimentos. ***** $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Sham; **\$** $P < 0,05$ comparado ao grupo Tadalafil; ****** $P < 0,01$ comparado ao grupo Sham; **#** $P < 0,05$ comparado ao grupo IC.

Figura 03. Efeito do BAY 73-6691 na avaliação contrátil da musculatura lisa cavernosa de ratos com IC. Curvas concentração-resposta para avaliação contrátil da musculatura lisa cavernosa para fenilefrina (PE 10nM-100 μ M) e estimulação elétrica (EFS 1-32Hz) dos grupos Sham (n=6) e IC (n=6) na presença e ausência do BAY 73-6691. Os dados foram expressos como Média $\pm$ E.P.M para n experimentos. ***** $P < 0,05$ quando comparado ao grupo Sham; **\$** $P < 0,05$ comparado ao grupo IC + BAY73-6691;

$\Phi P < 0,05$ comparado ao grupo Sham + BAY 73-6691; $**P < 0,01$ comparado ao grupo Sham; $\#P < 0,05$ comparado ao grupo IC.

Figura 04. Efeito do BAY 73-6691 em associação ao Tadalafil na contratilidade do CC de ratos com IC. Curvas concentração-resposta para avaliação contrátil da musculatura lisa cavernosa para fenilefrina (PE 10nM-100 μ M) e estimulação elétrica (EFS 1-32Hz) após tratamento crônico com Tadalafil do grupo IC Tadalafil (n=8), IC + Tadalafil + BAY 73-6691 (n=7) e grupo IC (n=7). Os dados foram expressos como Média $\pm$ E.P.M para n experimentos. $*P < 0,05$ quando comparado ao grupo IC; $**P < 0,01$ comparado ao grupo IC; $***P < 0,001$ comparado ao grupo IC.

Ilustrações

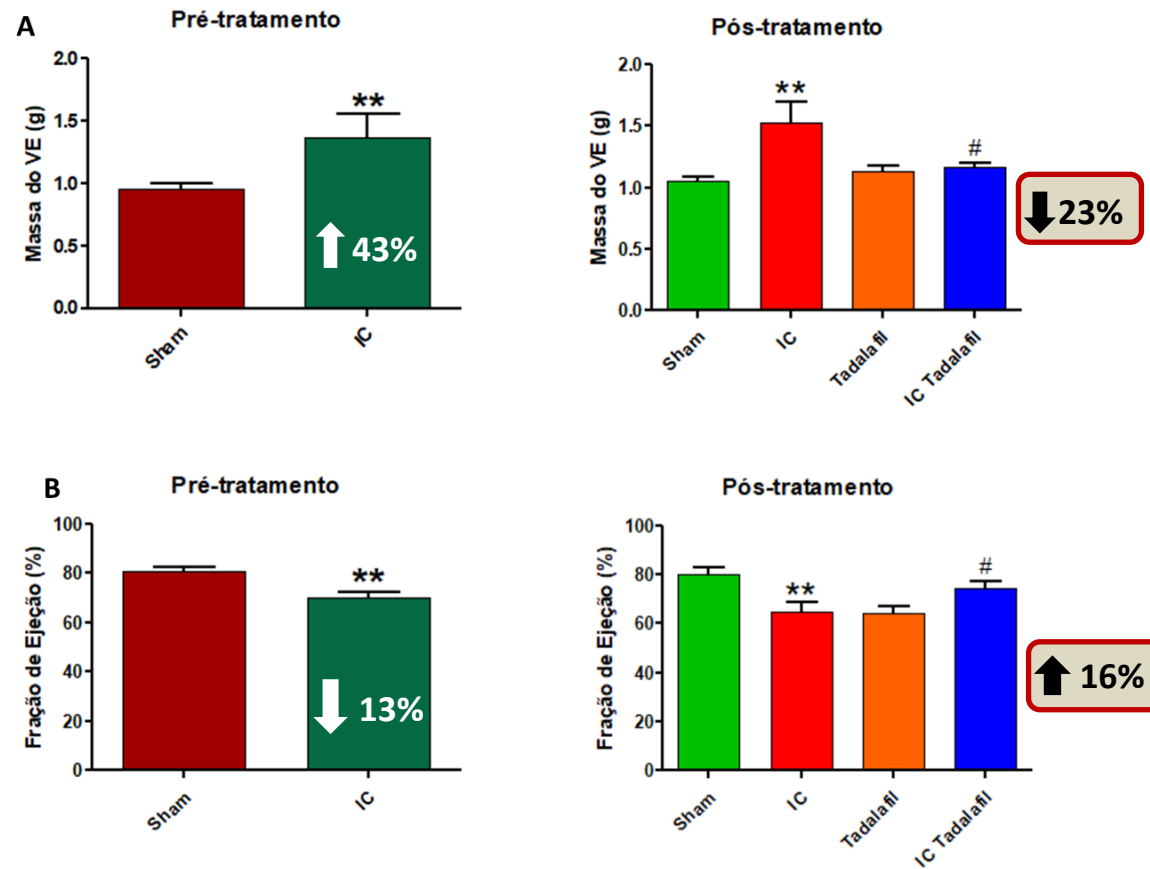


FIGURA 01

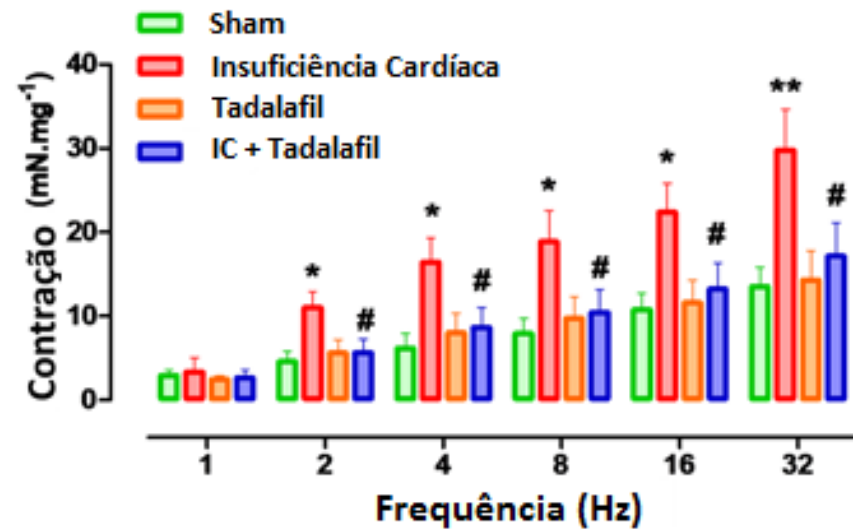
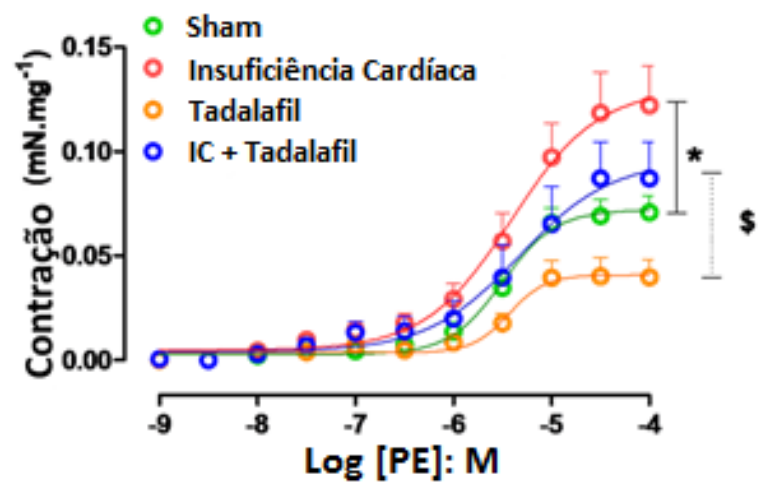


FIGURA 02

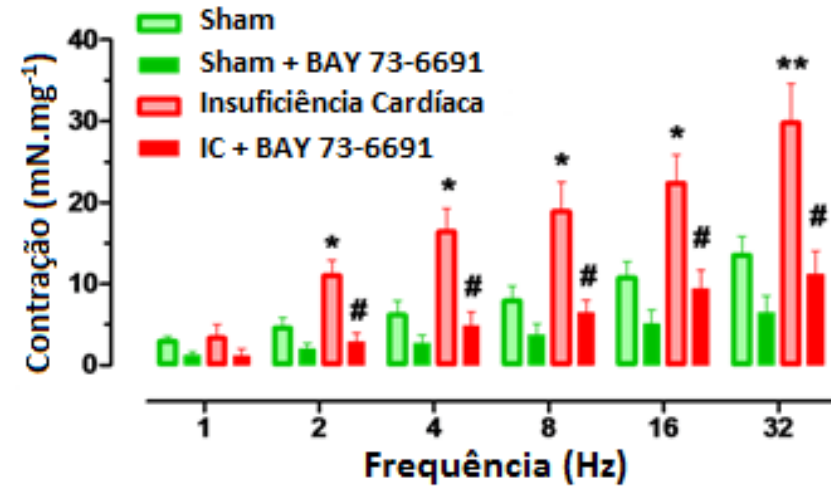
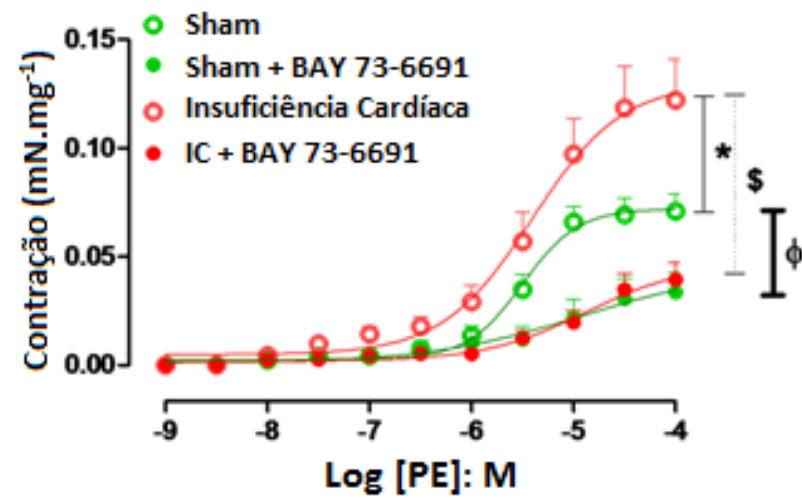


FIGURA 03

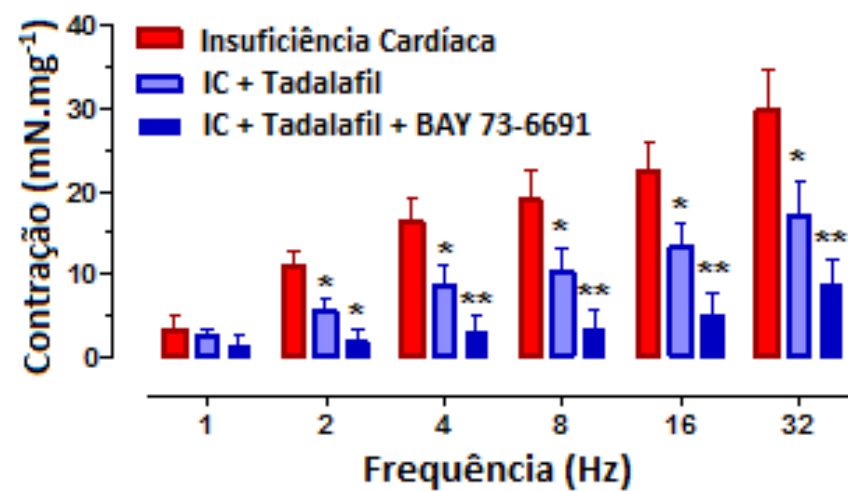
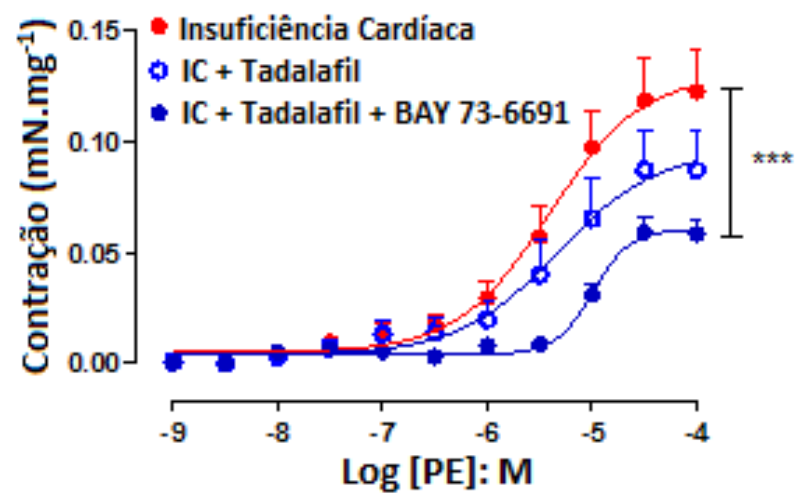


FIGURA 04