

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BRAILINA INDUZ RELAXAMENTO DE CORPOS CAVERNOSOS DE RATOS,
ENVOLVENDO A PARTICIPAÇÃO DA VIA ÓXIDO NÍTRICO/CICLASE DE
GUANILIL SOLÚVEL**

FÊNIX ALEXANDRA DE ARAUJO

Salvador - Bahia

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**BRILINA INDUZ RELAXAMENTO DE CORPOS CAVERNOSOS DE RATOS,
ENVOLVENDO A PARTICIPAÇÃO DA VIA ÓXIDO NÍTRICO/CICLASE DE
GUANILIL SOLÚVEL**

FÊNIX ALEXANDRA DE ARAUJO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para obtenção
do grau de mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Darízy Flávia Silva
Amorim de Vasconcelos

Salvador - Bahia

2020

"BRAILINA INDUZ RELAXAMENTO DE CORPOS CAVERNOSOS DE RATOS, ENVOLVENDO A PARTICIPAÇÃO DA VIA NO/sGC."

FÊNIX ALEXANDRA DE ARAUJO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 22 de maio de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Fernando Silva Carneiro
Professor
FMRP-USP



Dr. Kyan James Allahdadi
Pesquisador
CBTC - Hospital São Rafael



Dra. Cristiane Flora Villarreal
Professora
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) –

Código de Financiamento 001

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares que tanto amo, em especial aos meus pais, **Célio Roberto e Eulalia Batista**, por toda dedicação, incentivo, ensinamentos, educação e, principalmente, pelo carinho, atenção e amor. Obrigada por todos os momentos que ouviram meus planos, me incentivaram, me alertaram, enfim, agradeço por terem formado meu caráter, e me orientado a ser quem sou hoje.

Ao meu noivo **Gabriel da Penha**, que sempre me incentivou e me tranquilizou em tantos momentos em que estive aflita. Agradeço a você que sabe cada momento de realização, bem como dos momentos de angústia por que também faz parte do processo, das incertezas desse caminho da pesquisa científica. Agradeço ao seu companheirismo, sinceridade, amizade, atenção e zelo, que foram fundamentais para me estabilizar e me fazer sempre seguir em frente. E hoje compartilhamos ainda mais nossas alegrias e aflições, enfim, agradeço por ter você me acompanhando nessa jornada e que venham muitos outros caminhos a percorrer juntos.

Aos meus irmãos, **Aquiles e Ícaro**, que a cada dia se tornam rapazes tão atenciosos, e que me fazem sentir completa e cada vez mais disposta a crescer junto com vocês. Agradeço a **Tânia** por tantos ensinamentos, e por ser essa pessoa tão importante na minha vida, muito obrigada. Agradeço a minha avó **Tina** e minha tia **Ana** por estarem sempre dispostas a me aconselhar, e querer o meu bem.

Agradeço a professora **Darizy Flávia Silva** por acreditar no meu potencial, por me orientar nessa trajetória que não é fácil. Agradeço imensamente a todos os momentos de ensinamentos, te admiro muito. Agradeço por sempre estar disposta a sanar minhas dúvidas e anseios, além de acreditar na minha capacidade e oferecer todo apoio e estímulo à realização desse trabalho.

A família **LAFPEC**, sempre composta por uma equipe brilhante: Raiana, Liliane, Letícia, Quiara, Samuel, Isnar, Daniele, Gabriela e Rafael. Nesse ponto eu gostaria de agradecer especialmente a **Rafael Leonne** que sempre me apoiou, me ajudou em diversos aspectos seja nos momentos de inquietações, nos momentos de alegria, cada experimento, cada ideia, enfim muito obrigada Rafa. Agradeço também a **Raiana Moraes** que vem percorrendo essa trilha tortuosa que é fazer ciência, me ajudando bastante no desenrolar dessa caminhada.

Agradeço também a equipe do programa de pós-graduação por todo acolhimento e ajuda nesse período, em especial a **Noélia Santos e Simone Farias**, bem como a equipe da biblioteca do IGM.

Enfim, sou muito grata pelo carinho de todos citados aqui ou não, que fizeram parte dessa etapa do meu caminhar científico.

ARAÚJO, Fênix Alexandra de. Brailina induz relaxamento de corpos cavernosos de ratos, envolvendo a participação da via óxido nítrico/ciclase de guanilil solúvel. 92 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade recorrente e persistente de atingir ou manter uma ereção peniana satisfatória. No mundo, estima-se que aproximadamente 52% dos homens entre 40 e 70 anos sejam afetados. Além disso, estudos clínicos forneceram dados sólidos de que a DE é um sintoma sentinela em pacientes com doenças vasculares ocultas, em particular doença cardiovascular (DCV), e a DE é frequentemente encontrada em pacientes com hipertensão arterial. Devido a uma baixa resposta farmacológica aos inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (PDE-5) em pacientes com dano endotelial vascular, assim como vários efeitos colaterais cardíacos a essas drogas, a busca por novas terapias e alvos terapêuticos é de suma importância para o tratamento da DE. Os produtos naturais têm servido como uma importante fonte de drogas por séculos. Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstramos que a cumarina brailina induziu vasodilatação na artéria ilíaca, importante vaso de irrigação para parte inferior do corpo. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial terapêutico da cumarina brailina para tratamento da disfunção erétil associado à hipertensão. **MÉTODO:** Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA-ICS/UFBA (130/2017). Ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR, n=6) e wistar (para cada protocolo, n=5), 11-15 semanas, foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o pênis foi removido. Em seguida, os corpos cavernosos (CC) foram mantidos em banho de órgãos com solução de Krebs-bicarbonato a 37°C e aerados com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), conectados a um transdutor de força para realizar os ensaios de tensão isométrica. **RESULTADOS:** Brailina (10⁻⁵M-3x10⁻⁴M) foi capaz de promover relaxamento dependente da concentração em CC pré-contraído com fenilefrina (FEN) 10⁻⁵M (E_{3x10⁻⁴M}: 115,1±8,7; n=5). Além disso, após a exposição do tecido a brailina nenhuma mudança foi observada no tônus basal ou redução na capacidade de contração induzida por FEN. Em CC pré-contraído com solução de Tyrode KCl 80mM, brailina também induz relaxamento, (E_{3x10⁻⁴M}: 117,2±5,0; n=5). Na presença de L-NAME (10⁻⁴M), inibidor da sintase de óxido nítrico (NOS), o efeito relaxante induzido pela brailina foi reduzido (E_{3x10⁻⁵M}: 59,3±7,5; n=5; 38,2±4,0; n=5, ausência e presença de L-NAME, respectivamente). Redução do relaxamento foi mais pronunciada em todas as concentrações testadas na presença de ODQ (10⁻⁵M), um inibidor da ciclase de guanilil solúvel (sGC), enquanto que a inibição de proteína cinase G não alterou o relaxamento da brailina. Foi observado que a via adenilato ciclase/proteína cinase A não é importante para o relaxamento induzido por brailina, bem como brailina parece não alterar a contração induzida por norepinefrina e o relaxamento induzido por acetilcolina. Além disso, o relaxamento promovido por doador de óxido nítrico, NPS, foi melhorado na presença de brailina (NPS: E_{10⁻⁴M}: 61,7±7,6; n=5; na presença de brailina: 89,8±9,0; n=5). Em comparação, o efeito da brailina foi similar ao sildenafil na concentração de 10⁻⁴M (BRA: 92,9±9,4; n=5; SIL: 99,6±3,1; n=5). Por fim, brailina induziu efeito de relaxamento similar no CC de SHR, que é um modelo bem estabelecido de DE associado à hipertensão. **CONCLUSÃO:** Em resumo, os dados indicam que o relaxamento induzido por brailina envolve a via NO/sGC e que esta cumarina também é capaz de promover relaxamento em CC de animais com DE associado à hipertensão. Então, brailina poderia ser uma molécula potencial para o tratamento de DE.

Palavras-chave: Disfunção erétil; Brailina; Corpo cavernoso; Óxido nítrico; Ciclase de guanilil solúvel.

ARAÚJO, Fênix Alexandra de. Braylin induces relaxation of rat corpus cavernosum, involving the participation of nitric oxide/soluble guanylyl cyclase pathway. 92 f. il. Dissertation (Master's degree in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) – Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Erectile dysfunction (ED) is defined as the recurrent and persistent inability to achieve or maintain satisfactory penile erection. In the world, it is estimated that approximately 52% of men between 40 and 70 years old are affected. In addition, clinical studies have provided robust data that ED is a sentinel symptom in patients with occult vascular diseases, in particular cardiovascular disease (CVD), and ED is frequently encountered in patients with arterial hypertension. Due a low pharmacological response to phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors in patients with vascular endothelial damage, as well as several cardiac side effects to these drugs, the search for new drugs and therapeutic targets is of paramount importance to ED treatment. Thus, natural products have served as an important source of drug for centuries. In previous studies conducted by our research group, we have demonstrated that the coumarin braylin induced vasodilation in iliac artery, important irrigation vessel for the lower body. **AIM:** Evaluate the therapeutic potential of coumarin braylin for the treatment of erectile dysfunction associated with hypertension. **METHOD:** All experimental protocols were approved by CEUA-ICS/UFBA (130/2017). Spontaneously hypertensive male rats (SHR, n=6) and wistar (n=5), 11-15 weeks, were euthanized in CO₂ chamber and the penis was removed. Then, the corpora cavernosa (CC) were kept in an organ bath with Krebs-bicarbonate solution at 37°C and aerated with a carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂) and connected to a force transducer to perform isometric tension tests. **RESULTS:** Braylin (10⁻⁵M-3x10⁻⁴M) was able to promote concentration-dependent relaxation in CC pre-contracted with phenylephrine (Phe) 10⁻⁵M (E_{3x10⁻⁴M}: 115.1±8.7; n=5). Additionally, no change was observed in baseline tone after braylin exposure or reduction in the ability of Phe-induced contraction. In CC pre-contracted with KCl 80mM-tyrode solution, braylin also induced relaxation, (E_{3x10⁻⁴M}: 117.2±5.0; n=5). In the presence of L-NAME (10⁻⁴M), inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), the relaxant effect induced by braylin was reduced (E_{3x10⁻⁵M}: 59.3±7.5; n=5; 38.2±4.0; n=5, absence and presence of L-NAME, respectively). Reduced relaxation was more pronounced at all concentrations tested in the presence of ODQ (10⁻⁵M), an inhibitor of soluble guanylyl cyclase (sGC), while protein kinase G inhibition did not alter braylin relaxation. It was observed that the adenylyl cyclase/protein kinase A pathway is not important for braylin-induced relaxation, as well as braylin does not seem to alter norepinephrine-induced contraction and acetylcholine-induced relaxation. In addition, the relaxation promoted by nitric oxide donor, NPS, was improved in the presence of braylin (NPS: E_{10⁻⁴M}: 61.7±7.6; n=5; in the presence of braylin: 89.8±9.0; n=5). In comparison, the effect of braylin was similar to sildenafil at a concentration of 10⁻⁴M (BRA: 92.9±9.4; n=5; SIL: 99.6±3.1; n=5). Finally, braylin induced a similar relaxation effect in SHR CC, which is a well-established model of ED associated with hypertension. **CONCLUSION:** In summary, our data provide strong support that braylin induced relaxation involving NO/sGC pathway and this coumarin was able to promote relaxation effect in CC from animals with hypertension-associated ED. Then, braylin could be a potential molecule for the treatment of ED.

Keywords: Erectile dysfunction; Braylin; Corpus cavernosum; Nitric oxide; Soluble guanylyl cyclase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. As estruturas internas do pênis no estado ereto e flácido.....	17
FIGURA 2. Mecanismo celular envolvido na ereção peniana.....	21
FIGURA 3. Mecanismo celular envolvido na detumescência e flacidez peniana.....	23
FIGURA 4. Estrutura química da cumarina brailina.....	31
FIGURA 5. Banho de órgão isolado utilizado para os experimentos com corpo cavernoso de ratos.....	39
FIGURA 6. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina.....	40
FIGURA 7. Representação esquemática do protocolo experimental da avaliação da influência da brailina no tônus basal e na habilidade contrátil do corpo cavernoso isolado de rato.....	41
FIGURA 8. Esquema representativo do protocolo experimental do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso pré-contraídos com KCl 80mM.....	42
FIGURA 9. Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação das enzimas NOS, sGC e PKG no relaxamento promovido por brailina em tiras de corpos cavernosos de ratos pré-contraídos com fenilefrina.....	43
FIGURA 10. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina.....	44
FIGURA 11. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina.....	45
FIGURA 12. Representação esquemática do protocolo de avaliação da ação de brailina na tensão basal de tiras de corpos cavernosos, na contração induzida por fenilefrina, bem como sua participação no relaxamento promovido por nps em tiras de corpos cavernosos de ratos.....	46
FIGURA 13. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação da influência de brailina na contração induzida por NE e no relaxamento induzido por ACh.....	47
FIGURA 14. Veículo não é responsável pelo efeito relaxante observado da brailina.....	50
FIGURA 15. Efeito relaxante da cumarina brailina em tiras de corpos cavernosos isolados de ratos wistar.....	51
FIGURA 16. A cumarina brailina não altera o tônus muscular basal dos corpos cavernosos isolados de ratos wistar.....	52
FIGURA 17. Brailina não altera a capacidade contrátil de corpos cavernosos de ratos wistar.....	53
FIGURA 18. Efeito relaxante de brailina em tiras de corpos cavernosos isolados de ratos wistar, pré-contraídas com KCl 80mm.....	54
FIGURA 19. Participação da NOS no efeito relaxante de brailina em corpora cavernosa de rato.....	55
FIGURA 20. Participação da sGC no efeito relaxante da brailina em corpora cavernosa isolada de rato.....	56
FIGURA 21. PKG não participa do efeito relaxante induzido por brailina em corpora cavernosa.....	57
FIGURA 22. AC não participa do efeito relaxante induzido por brailina em corpora cavernosa.....	58
FIGURA 23. PKA não participa do efeito relaxante induzido por brailina em corpora cavernosa.....	59
FIGURA 24. Comparação do efeito relaxante de sildenafil e brailina.....	60
FIGURA 25. Verificação do efeito relaxante de sildenafil em corpo cavernoso de rato wistar.....	61
FIGURA 26. Contração induzida por ne não é influenciada por brailina.....	62
FIGURA 27. Relaxamento induzido por ACh não é influenciado por brailina.....	63
FIGURA 28. Brailina potencializa o relaxamento promovido por doador de óxido nítrico.....	64
FIGURA 29. Efeito relaxante da cumarina brailina em tiras de corpos cavernosos isolados de ratos SHR.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da solução Krebs-bicarbonato.....	38
Tabela 2: Composição de solução de Tyrode despolarizante KCl 80mm.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato ciclase
ADP	Adenosina difosfato (do inglês <i>adenosine diphosphate</i>)
Ca²⁺	Cálcio
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina (do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina (do inglês <i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
DAG	Diacilglicerol
DCNT	Doença crônica não transmissível
GTP	Guanosina Trifosfato (do inglês <i>guanosine triphosphate</i>)
IIEF	Índice internacional de função erétil (do inglês <i>International Index of Erectile Function</i>)
IP₃	Inositoltrifosfato (do inglês <i>inositoltriphosphate</i>)
iPDE-5	Inibidor de fosfodiesterase tipo 5 (do inglês <i>phosphodiesterase type 5 inhibitor</i>)
K⁺	Potássio
MLC	Cadeia leve da miosina (do inglês <i>myosin light chain</i>)
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina (do inglês <i>myosin light chain kinase</i>)
NANC	Não-adrenérgico, não-colinérgico
NE	Norepinefrina
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
NOS	Sintase do óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide sintase</i>)
PDE	Fosfodiesterase (do inglês <i>phosphodiesterase</i>)
PDE4	Fosfodiesterase tipo 4 (do inglês <i>phosphodiesterase type 4</i>)
PKA	Proteína cinase dependente de cAMP (do inglês <i>cAMP-dependent protein kinase</i>)
PKC	Proteína cinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PKG	Proteína cinase dependente de cGMP (do inglês <i>cGMP-dependent protein kinase</i>)
PLC	Fosfolipase C (do inglês <i>phospholipase C</i>)
QSM	Quociente sexual masculino
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
sGC	Ciclase de guanilil solúvel (do inglês <i>soluble guanylyl cyclase</i>)
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos (do inglês <i>spontaneously hypertensive rats</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 ANATOMIA PENIANA	16
2.2 IRRIGAÇÃO E DRENAGEM SANGUÍNEA PENIANA	17
2.3 NEUROFISIOLOGIA DA EREÇÃO	18
2.4 MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO ESTADO ERETO	19
2.5 MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO ESTADO FLÁCIDO E DETUMESCÊNCIA	22
2.6 DISFUNÇÃO ERÉTIL	24
2.6.1 Tratamento da disfunção erétil	26
2.7 DISFUNÇÃO ERÉTIL, HIPERTENSÃO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	27
2.8 MODELO EXPERIMENTAL DE DISFUNÇÃO ERÉTIL ASSOCIADA A HIPERTENSÃO	29
2.9 PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS.....	30
2.10 BRILINA.....	31
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 ANIMAIS	37
4.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	37
4.3 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA BRILINA	37
4.4 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS	38
4.5 PREPARAÇÃO DOS CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATO	39
4.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	40
4.6.1 Avaliação da viabilidade tecidual	40
4.6.2 Avaliação do efeito relaxante de brailina	40
4.6.3 Avaliação do efeito da brailina sobre o tônus basal	41
4.6.4 Avaliação da influência de brailina na contração induzida por fenilefrina	41
4.6.5 Avaliação do efeito relaxante de brailina em segmentos pré-contraídos por solução despolarizante	42
4.6.6 Avaliação do papel da via NOS/sGC/PKG no relaxamento induzido por brailina	43
4.6.7 Avaliação do papel da via AC/PKA no relaxamento induzido por brailina	44
4.6.8 Comparação entre o efeito relaxante de inibidor de fosfodiesterase e o efeito induzido por brailina	45
4.6.9 Avaliação da influência de brailina no relaxamento promovido por doador de óxido nítrico	46
4.6.10 Avaliação da influência de brailina na contração induzida por norepinefrina	47

4.6.11	Avaliação da influência de brailina no relaxamento induzido por acetilcolina	47
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5.	RESULTADOS	50
5.1	BRAILINA INDUZ EFEITO RELAXANTE EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS WISTAR	50
5.2	BRAILINA NÃO ALTERA O TÔNUS MUSCULAR BASAL DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS WISTAR	52
5.3	BRAILINA NÃO ALTERA A HABILIDADE CONTRÁTIL DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS WISTAR	53
5.4	BRAILINA PROMOVE RELAXAMENTO EM CORPOS CAVERNOSOS CONTRAÍDOS POR SOLUÇÃO DESPOLARIZANTE KCl 80mM	54
5.5	PARTICIPAÇÃO DA VIA NOS/sGC/PKG NO RELAXAMENTO PROMOVIDO POR BRAILINA	55
5.5.1	O relaxamento induzido por brailina depende em parte da NOS	55
5.5.2	O relaxamento promovido por brailina depende da participação da sGC	56
5.5.3	O relaxamento promovido por brailina não é afetado pela inibição da PKG	57
5.6	A VIA AC/PKA NÃO PARTICIPA DO RELAXAMENTO PROMOVIDO POR BRAILINA	58
5.6.1	O relaxamento promovido por brailina não depende da AC	58
5.6.2	O relaxamento promovido por brailina não é afetado pela inibição da PKA	59
5.7	COMPARAÇÃO DO EFEITO RELAXANTE INDUZIDO POR SILDENAFIL E BRAILINA	60
5.8	BRAILINA NÃO ALTERA A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR NOREPINEFRINA	62
5.9	BRAILINA NÃO ALTERA O RELAXAMENTO INDUZIDO POR ACETILCOLINA	63
5.10	BRAILINA POTENCIALIZA O EFEITO RELAXANTE DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO	64
5.11	BRAILINA INDUZ EFEITO RELAXANTE EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS SHR	65
6.	DISCUSSÃO	67
7.	CONCLUSÕES	77
8.	PERSPECTIVAS	79
8.1	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA BRAILINA SOBRE A EXPRESSÃO DE DIFERENTES PROTEÍNAS IMPORTANTES PARA A FUNÇÃO ERÉTIL	79
8.2	ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i>	80
8.3	ENSAIO DA APOMORFINA	80
	REFERÊNCIAS	83

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A disfunção erétil é uma doença que afeta a qualidade de vida do indivíduo acometido, tendo comprometimento da autoestima e de relacionamento interpessoal do paciente e de seus parceiros sexuais (ABDO et al., 2006). Pode-se definir a disfunção erétil como a incapacidade consistente ou recorrente de um homem de atingir e/ou manter uma ereção peniana suficiente para a atividade sexual satisfatória (LUE et al., 2004). É importante ressaltar que a disfunção erétil é uma condição com alta prevalência. Estima-se que 37,2 – 48,6% dos homens acima de 18 anos apresentam algum grau de disfunção erétil (GOLDSTEIN et al., 2020). E no Brasil esses dados também são alarmantes, onde a prevalência é de 37,2% dos homens acima de 18 anos (GOLDSTEIN et al., 2020).

É preconizado que o indivíduo diagnosticado com disfunção erétil tenha mudanças no seu estilo de vida e adquira hábitos saudáveis, que possam melhorar o quadro da doença e de condições clínicas associadas. Isso por que a disfunção erétil está associada a alguns fatores de risco, dentre eles, o envelhecimento, diabetes, doença cardiovascular, hipertensão, tabagismo, hipogonadismo e depressão (DELAY; HANEY; HELLSTROM, 2016). Dessa forma, torna-se evidente que a disfunção erétil é uma doença complexa e por vezes requer atenção multiprofissional para seu tratamento.

É descrito que indivíduos hipertensos têm aumento do risco de desenvolver disfunção erétil em comparação aos indivíduos sem essa comorbidade (MOREIRA et al., 2003a). Vale ressaltar que a hipertensão e disfunção erétil apresentam fatores de risco em comum incluindo a disfunção endotelial e aumento de espécies reativas de oxigênio (FELDMAN et al., 1994). É importante notar que quanto mais severo o quadro de disfunção erétil, maior é o risco de desenvolver doença isquêmica do coração, infarto, doença vascular periférica e morte (BANKS et al., 2013). Dados na literatura sugerem que a disfunção erétil pode ser considerada um marcador de doença cardiovascular por anteceder em até 3 anos a doença arterial coronariana (THOMPSON et al., 2005). Sabendo-se que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, torna-se evidente que a identificação de pacientes com disfunção erétil poderia auxiliar estratégias de intervenção prévia para o tratamento de doença cardiovascular.

Além disso, o tratamento farmacológico de primeira escolha para disfunção erétil são os inibidores da fosfodiesterase tipo-5 (iPDE-5) (TERRETT et al., 1996). Apesar do sucesso terapêutico, esse tratamento pode promover alguns efeitos adversos no indivíduo, como dores de cabeça, distúrbios visuais, rinite, rubor, dispepsia (indigestão) (GOLDSTEIN et al., 2002). Esses efeitos adversos contribuem para a descontinuação do tratamento oral. Em adição,

pacientes que apresentam disfunção endotelial, diabéticos e que passaram por prostatectomia respondem menos aos iPDE5 (BURNETT et al., 2018).

Levando em consideração a fisiologia da ereção e os mecanismos celulares envolvidos na regulação do estado flácido e ereto, substâncias que atuam relaxando a musculatura lisa de artérias e do corpo cavernoso são uma estratégia importante para o tratamento da disfunção erétil (ANDERSSON, 2003). Logo, deve ser realizada a busca por novas moléculas bioativas com ação vasodilatadora e relaxante da corpo cavernoso a fim de ampliar as opções terapêuticas dos indivíduos com disfunção erétil.

O entendimento sobre a ação de um composto bioativo sobre um sistema biológico é uma estratégia importante para o mapeamento de novas drogas que podem servir como moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos (DUTRA et al., 2016). Visto isso, as cumarinas são compostos de interesse, uma vez que já são descritas várias ações destas em modelos experimentais e na clínica, a exemplo da cumarina varfarina utilizada como anticoagulante (JOHNSON et al., 2017); a cumarina psoraleno utilizada juntamente com radiação UVA para o tratamento de afecções dermatológicas (CARRASCOSA; PLANA; FERRÁNDIZ, 2013) e a cumarina benzopirona utilizada para melhora da circulação periférica com a finalidade de reduzir edema e inflamação (BADGER et al., 2004).

A brailina é uma piranocumarina que já foi descrita na literatura em inibir a agregação plaquetária (TSAI et al., 1998); atuar no sistema imunológico ao apresentar atividade anti-inflamatória, imunomodulatória e antinociceptiva (ESPÍRITO-SANTO et al., 2017); atuar como possível inibidora de PDE-4 (LIN et al., 2014); bem como nosso grupo de pesquisa descreveu sua ação vasodilatadora em artérias mesentérica e ilíaca isoladas de ratos wistar (em processo de submissão).

Diante da alta prevalência de indivíduos diagnosticados com DE e a forma como essa disfunção afeta a qualidade de vida dos pacientes e de seus parceiros sexuais, bem como sua relação com as doenças cardiovasculares, o tratamento dessa doença deve ser ampliado. Novas terapias devem ser elucidadas a fim de agregar os indivíduos que não respondem ao tratamento atual ou mesmo melhorando a resposta terapêutica dos indivíduos que já fazem uso de iPDE5. Levando em consideração o conhecimento da literatura acerca de moléculas bioativas e de suas potenciais atividades farmacológicas, gerou-se a hipótese de que a brailina relaxa corpo cavernoso e vasos sanguíneos favorecendo a função erétil, servindo como uma molécula bioativa para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da disfunção erétil associada a hipertensão.

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O levantamento bibliográfico prévio para melhor entendimento sobre a fisiologia da ereção e a fisiopatologia da disfunção erétil é fundamental para traçar novos alvos terapêuticos, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos. Então inicialmente será abordado sobre a anatomia peniana, hemodinâmica e neurofisiologia envolvida no processo de ereção, seguido dos mecanismos celulares que participam da regulação do estado flácido e ereto do pênis. Posteriormente será abordado sobre vários aspectos da disfunção erétil, desde seu diagnóstico aos possíveis tratamentos indicados, seguido da descrição do modelo experimental e o potencial farmacológico da cumarina brailina para o tratamento da disfunção erétil.

2.1. ANATOMIA PENIANA

O pênis faz parte de dois sistemas, o excretor e reprodutor, apresenta capacidade erétil devido a presença de três tecidos eréteis, um par de corpos cavernosos e o corpo esponjoso (FERNANDES; SOUZA; CARTAFINA, 2018). O corpo esponjoso está localizado na porção ventral do pênis e é envolvido na porção inicial pelo músculo esquelético bulbocavernoso, o corpo esponjoso envolve a uretra e alonga-se até a parte distal do pênis formando a glândula. Enquanto os corpos cavernosos são localizados lateralmente, formados inicialmente pelo par de cruras na região próxima ao osso da pelve e se alongam até o início da glândula. As cruras são estruturas de músculo liso que são recobertas pelo músculo esquelético isquiocavernoso. A corpora cavernosa é o principal tecido com capacidade erétil e é responsável pelo maior aumento do tamanho e rigidez do pênis no momento da ereção (TUDORIU; BOURMER, 1983). Aproximadamente, 40-50% da área seccional do corpo cavernoso é formado por músculo liso trabecular o qual é recoberto pela túnica albugínea (NEHRA et al., 1998). A túnica albugínea é uma camada fibrosa externa ao corpo cavernoso e possui a capacidade de expandir durante a tumescência do pênis no momento da ereção. É importante ressaltar que modelos animais de disfunção erétil apresentam níveis menores de músculo liso, a exemplo do modelo com aterosclerose que apresenta apenas 30 a 35% de músculo liso trabecular (NEHRA et al., 1998). O conteúdo de músculo liso trabecular está diretamente relacionado a capacidade de expansão do corpo cavernoso, assim como a composição de colágeno e elastina e a regulação adequada das fibras nervosas e do fluxo sanguíneo nos espaços sinusoidais (QIAO et al., 2017). Sendo assim, alterações morfológicas ou funcionais nesses tecidos estão intimamente ligadas a presença e ao grau de disfunção erétil.

2.2. IRRIGAÇÃO E DRENAGEM SANGUÍNEA PENIANA

A quantidade de sangue que preenche o pênis no momento da ereção é uma consequência de alterações no fluxo sanguíneo de artérias pré-penianas, arteríolas, microvasculatura do pênis e a regulação da drenagem sanguínea nas vênulas e veias (**FIGURA 1**). O pênis é irrigado por três grupos de artérias principais, as cavernosas, as dorsais e a bulbouretral e todas elas são originadas de ramificações da artéria pudenda interna que se encontra na porção pré-peniana. A irrigação das trabéculas do corpo cavernoso é realizada pelas artérias helicinas que são ramificações das artérias cavernosas. Há evidências que sugerem que a artéria pudenda interna seja responsável por 70% da resistência a irrigação sanguínea ao pênis, enquanto que a vasculatura peniana represente o restante da resistência (MANABE et al., 2000). A drenagem sanguínea é realizada principalmente pela veia dorsal que também recebe a drenagem feita pelas veias circunflexas.

No estado flácido a musculatura lisa está tonicamente contraída permitindo o fluxo sanguíneo somente para aporte nutricional e de moléculas sinalizadoras, nesse estado a pressão de oxigênio é em torno de 35mmHg. Em contrapartida, na ereção a pressão intracavernosa aumenta para 100mmHg, havendo a possibilidade dessa pressão aumentar na fase rígida, no momento de contração dos músculos isquicavernosos e bulbouretrais, podendo alcançar valores superiores a pressão sistólica (SATTAR et al., 1995).

O estímulo erétil iniciado, seja de origem psicológica, sensorial ou a junção de ambos, estimula a liberação de substâncias do endotélio e de terminações nervosas que relaxam a musculatura lisa que recobre os espaços trabeculares e das artérias, aumentando o fluxo sanguíneo; o sangue então é estocado nos sinusóides dilatados dos corpos cavernosos; que leva a compressão física das vênulas e veias pelo intumescimento dos tecidos eréteis, reduzindo a drenagem sanguínea, no processo de veno-oclusão **FIGURA 1** (GRATZKE et al., 2010).

Passado o estímulo erétil e iniciado a resolução da ereção, o pênis sofre algumas alterações para retornar ao estado flácido. A detumescência é caracterizada por inicialmente, haver pequeno aumento da pressão intracavernosa como consequência da contração da musculatura lisa; em seguida há o término da veno-oclusão com consequente rápida diminuição da pressão sanguínea no corpo cavernoso (DEAN; LUE, 2005).

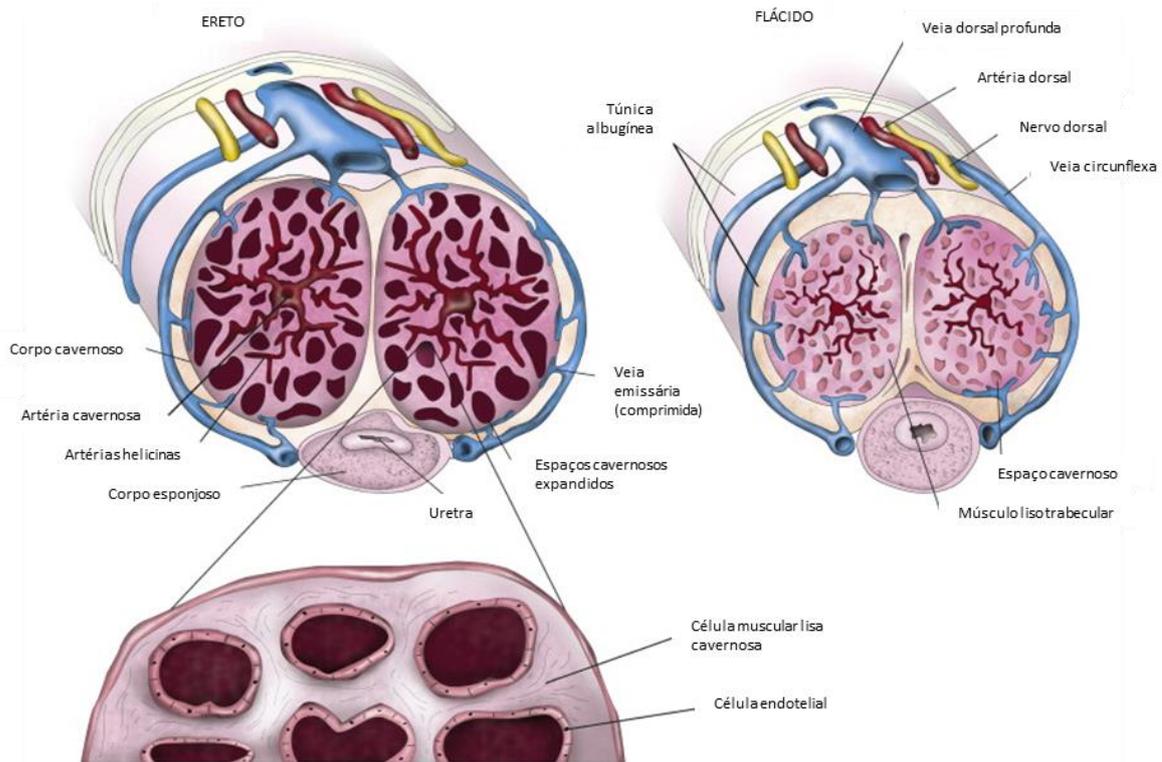


FIGURA 1. As estruturas internas do pênis no estado ereto e flácido.

Fonte: Modificado (RITCHIE; SULLIVAN, 2011)

2.3. NEUROFISIOLOGIA DA EREÇÃO

A regulação da ereção e promoção do maior influxo sanguíneo ao pênis é realizada principalmente pelo sistema nervoso. O pênis é inervado por terminações autonômicas (simpática, parassimpática e não-adrenérgicas não-colinérgicas “NANC”) e somáticas (motores e sensoriais) (BELLA; BRANT; LUE, 2007). Os nervos autonômicos correspondem a principal inervação reguladora entre o estado flácido e ereto. As inervações simpática e parassimpática regulam o estado de flacidez e tumescência, respectivamente, sendo que ambos são originados da medula espinhal e do gânglio pélvico formando o nervo cavernoso. O nervo cavernoso quando danificado, geralmente por prostatectomia, ocasiona desequilíbrio da regulação autonômica, por vezes levando ao quadro de disfunção erétil. Já as fibras NANC tem papel importante ao liberar óxido nítrico e desencadear o processo de vasodilatação e relaxamento do músculo liso trabecular. Enquanto a inervação motora está relacionada a contração dos músculos esqueléticos bulbocavernoso e isquiocavernoso, caracterizando a fase de ereção rígida e ejaculação. Adicionalmente, há as fibras sensoriais que formam o nervo dorsal e são responsáveis por detectar estímulos táteis na região peniana. Há também a participação do nervo pudendo formado por fibras motoras e sensoriais. Por fim, a interação entre as vias centrais e

periféricas em conjunto coordenam o estado de flacidez e ereção peniana (NUNES; WEBB, 2012).

2.4. MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO ESTADO ERETO

A ereção é mediada por mecanismos celulares que promovem o relaxamento da musculatura lisa presente nas artérias e nos tecidos eréteis. Dado o estímulo sexual, há a ativação dos nervos parassimpáticos e das fibras não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC) que induzem o relaxamento do músculo liso, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo e pressão intracavernosa, resultando na ereção. O principal mediador relaxante é o óxido nítrico (NO) que é liberado pelas fibras NANC (ANDERSSON, 2001).

O NO também pode ser liberado pelas células endoteliais após estímulo das fibras colinérgicas que impedem a liberação de noradrenalina do nervo simpático e liberam acetilcolina que estimula a produção de NO pelas células endoteliais. O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que apresenta três subtipos: a endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS) (BOER et al., 2000). A NOS por meio de reações de oxirredução em cadeia utiliza como substrato o aminoácido essencial L-arginina e oxigênio, tendo como produto de reação, o aminoácido não codificado pelo DNA de humanos, a L-citrulina e liberação de NO.

O NO é um mediador gasoso que se difunde entre as membranas celulares, atuando em alvos moleculares presentes nas células adjacentes, como a célula muscular lisa. Uma das principais proteínas influenciadas pelo NO na célula muscular lisa é a ciclase de guanilil solúvel (sGC) que catalisa a conversão do nucleotídeo guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) com liberação de pirofosfato. As GC podem ser encontradas em duas formas: a particulada (pGC) e solúvel (sGC) (DERBYSHIRE; MARLETTA, 2012). É descrito que o NO interage no grupo heme da sGC favorecendo a mudança conformacional que leva a sua ativação e conseqüente formação de cGMP. O cGMP é um segundo mensageiro importante para a transdução de sinal para relaxamento da musculatura lisa. Ao ser formado o cGMP pode atuar em três vias: ativação da proteína cinase dependente de cGMP (PKG); ativação de canais iônicos sensíveis a nucleotídeos cíclicos e ser degradado pela enzima fosfodiesterase (PDE) (HOFMANN; AMMENDOLA; SCHLOSSMANN, 2000).

Além do cGMP, o monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) é um importante mensageiro secundário na via de relaxamento da célula muscular lisa. A enzima ciclase de adenilil (AC) catalisa a conversão do nucleotídeo adenosina trifosfato em cAMP. A ativação da AC é resultado da ligação de substâncias vasodilatadoras a um receptor ligado a proteína Gs, a exemplo da prostaglandina E1, um análogo dessa substância é o fármaco alprostadil, que é

utilizado para o tratamento da disfunção erétil. O cAMP formado pode ativar a proteína cinase dependente de cAMP (PKA) e também pode ser degradado pela ação de PDE. O cGMP inibe a migração da proteína GTPase monomérica RhoA, impedindo a ativação da via RhoA-Rho cinase de sensibilização ao Ca^{2+} e de favorecimento da contração muscular (GRATZKE et al., 2010). As enzimas PKG e PKA fosforilam proteínas específicas e atuam induzindo a retirada de íons Ca^{2+} do citosol, seja por diminuir o influxo ou aumento da recaptção desse íon pelo retículo sarcoplasmático. Adicionalmente, elas favorecem a hiperpolarização celular ao permitir a saída de íons K^+ , além de inibir a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) desfavorecendo o estado contraído e a consequente flacidez peniana (**FIGURA 2**).

A via de sinalização de cGMP e cAMP é terminada quando a PDE lineariza esses nucleotídeos a 5'GMP e 5'AMP, respectivamente. Assim, a atuação de PDE cessa o estímulo celular relaxante promotor da ereção. Dessa forma, as PDE são enzimas importantes para a detumescência e manutenção do estado flácido peniano. Há ao menos 11 famílias de PDE que apresentam regiões conservadas no sítio catalítico, entretanto apresentam diferença quanto a expressão tecidual e especificidade de substrato (GHALAYINI, 2004).

Então, ao inibir a PDE os níveis intracelulares desses segundos mensageiros serão aumentados, sendo esse o mecanismo de ação dos fármacos de primeira linha para o tratamento da disfunção erétil (inibidores de PDE-5). O primeiro fármaco dessa classe de medicamentos foi o citrato de sildenafil, potente inibidor de PDE-5 (iPDE-5), que é um tipo específico para o cGMP (MORELAND; GOLDSTEIN; TRAISH, 1998). Ao inibir a ação de PDE, o cGMP formado não sofre degradação e pode então atuar por mais tempo induzindo efeito relaxante na musculatura lisa.

Fatores que diminuem a biodisponibilidade de NO, ou que reduzem a ativação dos mecanismos celulares de promoção do relaxamento afetam diretamente a pressão intracavernosa e consequentemente a ereção. O aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e disfunção endotelial são fatores associados a diminuição da capacidade erétil e vascular. Curiosamente, esses fatores estão aumentados em quadros de disfunção erétil vasculogênica assim como em outras condições clínicas ligadas ao sistema cardiovascular como a aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica, em que o estímulo contrátil está positivamente regulado (ANDERSSON, 2003).

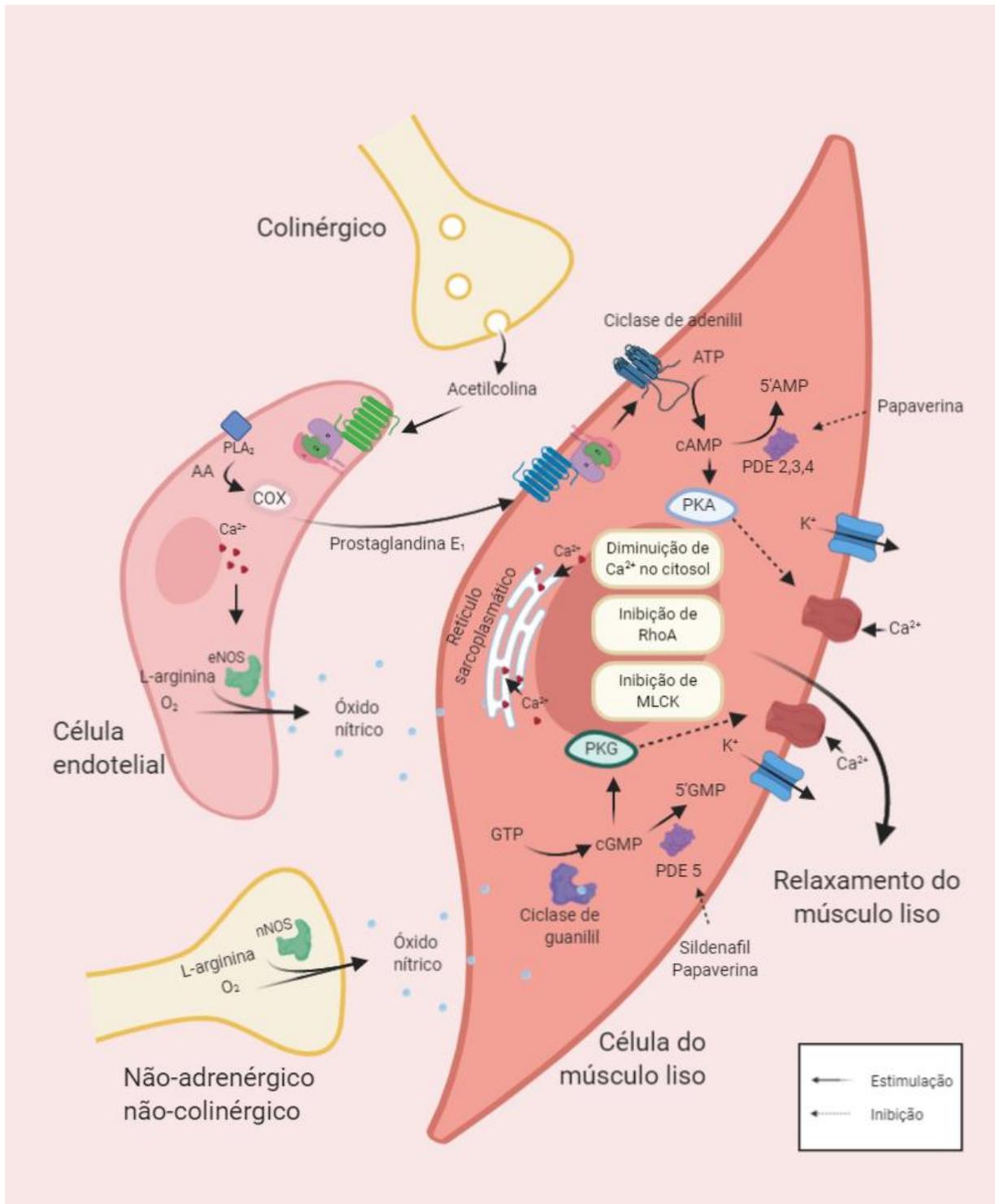


FIGURA 2. Mecanismo celular envolvido na ereção peniana.

Fonte: Autora. Criado com BioRender.com

2.5. MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NO ESTADO FLÁCIDO E DETUMESCÊNCIA

O tecido peniano é mantido no estado flácido pela atuação da inervação simpática, que mantém a musculatura lisa de artérias e do corpo cavernoso no estado contraído, diminuindo o fluxo sanguíneo, a pressão intracavernosa e conseqüentemente mantendo o pênis no estado flácido (GIULIANO et al., 1993). O principal mediador da ação simpática é o neurotransmissor norepinefrina (NE) (**FIGURA 3**).

Ao interagir com seus receptores acoplados a proteína G na membrana da célula muscular lisa, a NE induz mecanismos contráteis ao estimular a via de contração dependente de Ca^{2+} e a via de sensibilização ao Ca^{2+} . A via da RhoA-Rho cinase é importante para a sensibilização ao Ca^{2+} da célula muscular lisa, favorecimento ao estado contraído, com conseqüente manutenção da flacidez peniana. A desregulação desse mecanismo de contração é descrita em quadros de disfunção erétil em que essa via está positivamente regulada, tornando mais dificultada a promoção da ereção (CHITALEY; WESSELLS, 2004).

A via de contração dependente de Ca^{2+} é conseqüência, principalmente, da ativação da enzima fosfolipase C (PLC), devido a liberação de noradrenalina pelos nervos adrenérgicos. A PLC degrada o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol bifosfato à diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP_3), ambos os produtos da clivagem atuam em mecanismos celulares que induzem o estado contraído da musculatura lisa. O DAG aumenta a dinâmica da maquinaria contrátil pela ativação da enzima proteína cinase C (PKC), enquanto que o IP_3 liga-se a seu receptor na membrana do retículo sarcoplasmático e promove a liberação de Ca^{2+} armazenado para o citosol (MORELLI et al., 2006).

O Ca^{2+} também pode ser liberado do retículo sarcoplasmático pelos receptores de rianodina. Esses receptores estão envolvidos na via de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , uma vez que o aumento desse íon no meio citosólico promovida pela abertura dos canais de cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v) ativam os receptores de rianodina que então promovem a saída de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (HAMADA; MIKOSHIBA, 2019).

Além da NE ativar as vias de contração da célula muscular lisa, esse neurotransmissor simpático também inibe diretamente uma das vias de relaxamento. Por meio da ativação do receptor α_2 , que é um receptor acoplado a proteína G_i , a NE inibe a enzima AC, dessa forma reduz a sinalização de relaxamento promovida pelo cAMP (DEAN; LUE, 2005).

Outro fator importante para manutenção do estado flácido é a endotelina liberada por células endoteliais. Essa molécula atua no músculo em seus receptores acoplados a proteína G e também promove a ativação de PLC e sua cascata de sinalização aumentando o Ca^{2+} citosólico

(RITCHIE; SULLIVAN, 2011). O Ca^{2+} liberado no citosol pode interagir com a calmodulina favorecendo a contração do músculo liso. Por isso, nos mecanismos de indução do relaxamento a sinalização celular promove a retirada do Ca^{2+} do citosol, enquanto a sinalização de promoção da contração envolve a liberação do Ca^{2+} no citosol para ativar a maquinaria contrátil. O aglomerado Ca^{2+} -calmodulina ativa a proteína cinase da cadeia leve de miosina (MLCK) que fosforila a cadeia leve de miosina (MLC) favorecendo o acoplamento da MLC aos filamentos de actina.

A desregulação dos mecanismos celulares de contração influencia diretamente na obtenção e manutenção da ereção peniana. O aumento de ativação de mecanismos contráteis e diminuição da regulação de mecanismos pró-relaxantes podem dificultar a obtenção da ereção e favorecer o quadro de disfunção erétil (CHITALEY; WESSELLS, 2004).

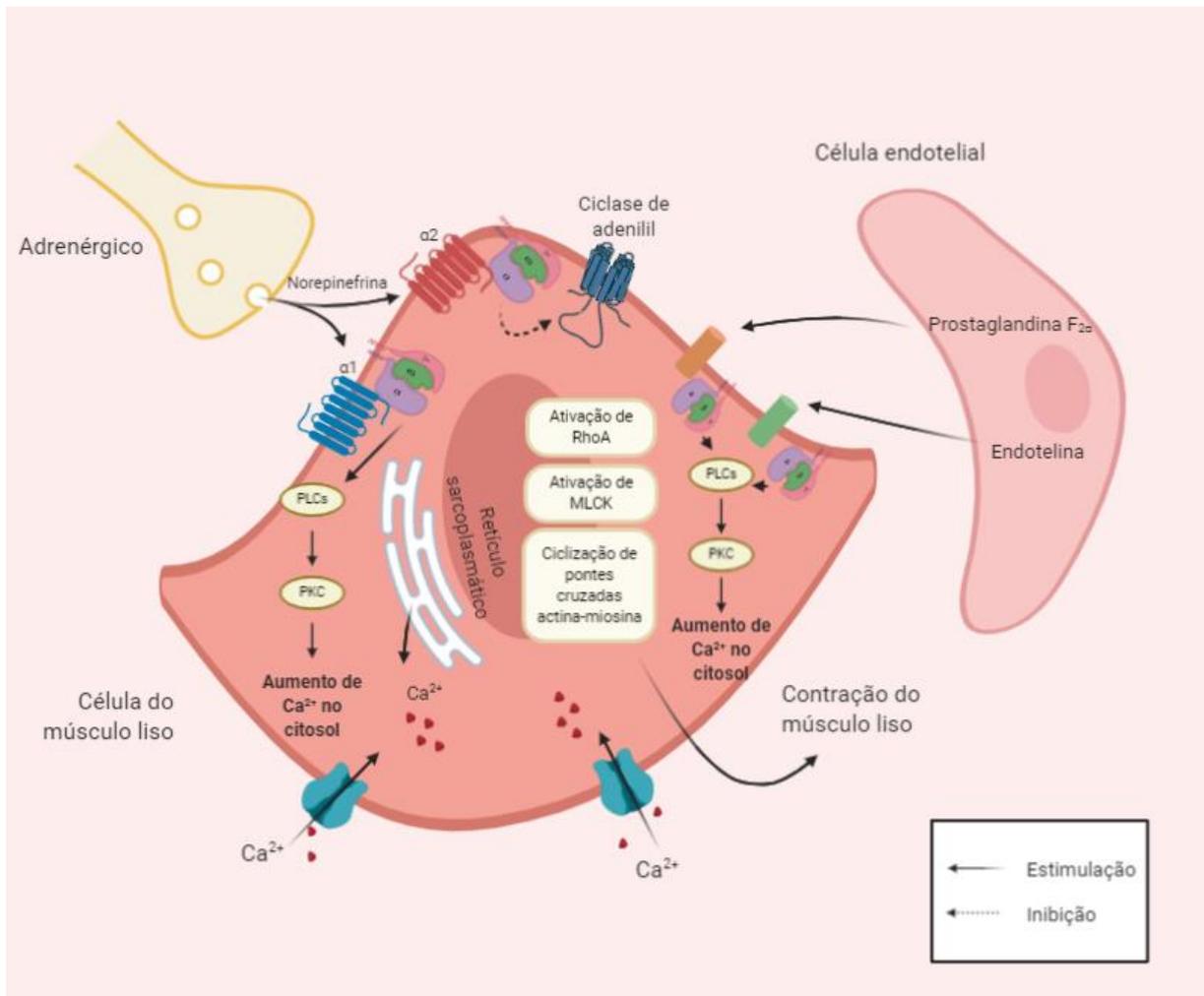


FIGURA 3. Mecanismo celular envolvido na detumescência e flacidez peniana.

2.6. DISFUNÇÃO ERÉTIL

A disfunção erétil é definida como a incapacidade consistente ou recorrente de um homem de atingir e/ou manter uma ereção peniana suficiente para a atividade sexual satisfatória (LUE et al., 2004). Pode ser desencadeada por múltiplos fatores, como a produção insuficiente de andrógeno, dano neurovascular, dano a estrutura do órgão genital masculino ou até mesmo fatores psicogênicos, como depressão (NIH CONSENSUS CONFERENCE, 1993).

Alguns estudos epidemiológicos foram realizados para caracterizar a prevalência de disfunção erétil, porém os resultados apresentam algumas divergências, podendo variar de 3-76%, devido ao uso de diferentes metodologias e características populacionais (KESSLER et al., 2019). Porém, de maneira geral, estima-se que 37,2 – 48,6% dos homens acima de 18 anos apresentam algum grau de disfunção erétil (GOLDSTEIN et al., 2020). Em 2007 foi publicado um estudo que estimou que cerca de 18 milhões de homens acima de 20 anos apresentam disfunção erétil nos Estados Unidos (SELVIN; BURNETT; PLATZ, 2007). Enquanto no Brasil, um estudo epidemiológico realizado com 2862 homens maiores de 18 anos provindos de 18 cidades, apontou que 45,1% desses homens apresentaram disfunção erétil, entre eles 31,2% apresentaram disfunção erétil mínima, 12,2% moderada e 1,7% completa (ABDO et al., 2006). Dados mais recentes trazem que 37,2% dos homens no Brasil apresentam algum grau de disfunção erétil (GOLDSTEIN et al., 2020). Nesse mesmo estudo, os indivíduos com acometidos apresentaram modificações no padrão comportamental, como comprometimento da autoestima e de relacionamento interpessoal. Indicando assim, que a disfunção erétil pode comprometer não somente o ato sexual, mas também questões sociais relacionadas a fatores psicológicos.

Na cidade de Salvador, capital do estado da Bahia, foi realizado um estudo epidemiológico em 2002 que foi obtido a prevalência de 39,5% de disfunção erétil entre os 605 participantes entre 40 a 70 anos (MOREIRA et al., 2002). Em 2003 foi publicado um estudo de coorte que avaliou a incidência de disfunção erétil, em Salvador, e obteve-se o quadro de 65,6 casos a cada 1000 indivíduos por ano (MOREIRA et al., 2003b). Tendo em vista que a disfunção erétil é um problema de saúde mundialmente, esses dados evidenciam o impacto da prevalência de indivíduos com disfunção erétil e a importância da busca pela compreensão dos fatores de risco associados a essa doença, assim como da descoberta de novas abordagens terapêuticas para seu tratamento.

É descrito na literatura alguns fatores que estão associados ao surgimento de disfunção erétil, dentre eles, idade, diabetes, doença cardiovascular, hipertensão, tabagismo, hipogonadismo e depressão (DELAY; HANEY; HELLSTROM, 2016). Dos fatores de risco

podemos destacar a relação do envelhecimento com o aparecimento de disfunção erétil, em que a frequência de disfunção erétil moderada e completa aumenta com a idade (MCCABE et al., 2016). A prevalência da doença pode ser considerada de 15% em homens entre 40-49 anos, varia de 20-40% em homens entre 60-69 anos e mais de 50% dos homens acima de 70 anos. Há também evidências de que diabetes também é fator de risco, em que é sugerido a prevalência de disfunção erétil em pacientes diabéticos de 52,5% e que esses pacientes tem 3,5 vezes mais chance de desenvolver a doença do que indivíduos não diabéticos (KOUIDRAT et al., 2017).

Adicionalmente, indivíduos hipertensos tem aumento do risco de desenvolver disfunção erétil comparado aos indivíduos sem essa comorbidade (MOREIRA et al., 2003a). Além do mais, 61% dos indivíduos hipertensos apresentam algum grau de disfunção erétil (GIULIANO et al., 2004). Foi descrito também que indivíduos autodeclarados negros tinham maior correlação com o surgimento da doença, do que indivíduos brancos (MOREIRA JR ED, ABDO CHN, TORRES EB, LOBO CFL, 2001). Esse fato também é curioso, uma vez que indivíduos negros apresentam maior prevalência de hipertensão do que indivíduos não negros, bem como apresenta maior dificuldade no controle e mais risco de desenvolver complicações cardiovasculares decorrentes da hipertensão (CHOR et al., 2015), corroborando assim que há a relação entre doença cardiovascular e disfunção erétil.

A disfunção erétil apresenta diversas etiologias, pode ser considerada de origem orgânica, psicológica ou mista. Alterações anatômicas e locais podem afetar a ereção, a exemplo de pacientes com aterosclerose em que há diminuição da oxigenação e consequente fibrose localizada, diminuindo a capacidade de expansão do corpo cavernoso e artérias, desfavorecendo a ereção. Adicionalmente, outros fatores também podem desencadear a disfunção erétil, a exemplo de distúrbios neurais como a depressão e condições iatrogênicas, como complicações pós-operatórias de retirada da próstata que podem danificar o nervo cavernoso comprometendo a ativação somática da ereção (SIMOPOULOS; TRINIDAD, 2013). Dessa forma, a disfunção erétil é uma doença complexa e por vezes requer atenção multiprofissional para seu tratamento e diferentes estratégias para seu diagnóstico.

O diagnóstico da disfunção erétil é realizado por abordagens de autoavaliação do paciente, assim como por exames clínicos e de imagem. O indivíduo quando procura assistência médica para tratar a provável disfunção erétil é solicitado a responder um questionário de autoavaliação que compreende o índice internacional de função erétil (IIEF)(ROSEN et al., 1997). Nesse questionário há a avaliação sobre a função erétil, orgasmo, desejo sexual, satisfação no intercursos e a satisfação geral descrita pelo próprio paciente, ao fim um escore é gerado de acordo com as respostas dos indivíduos, os quais podem ser classificados como sem

disfunção erétil, disfunção erétil leve, leve a moderada, moderada ou grave. Adicionalmente, há o quociente sexual masculino (QSM) que pode ser gerado após o indivíduo responder o questionário sobre a sua função e satisfação sexual. Além disso, podem ser realizados outros exames, a exemplo do teste da ereção fármaco-induzida com papaverina ou prostaglandina E1, teste de tumescência noturna, ultrassonografia com Doppler do pênis e arteriografia para avaliar a função vascular dos indivíduos (CARNEIRO et al., 2020). De maneira geral, a disfunção erétil é uma doença autorreferida e é necessário que o paciente exponha a situação ao médico para que haja o diagnóstico e acompanhamento adequado.

2.6.1. Tratamento para disfunção erétil

O indivíduo diagnosticado com disfunção erétil é então encaminhado para o devido tratamento. É preconizada a mudança no estilo de vida, no qual o indivíduo deve apresentar hábitos mais saudáveis a fim de evitar complicações ou o surgimento de condições clínicas associadas (MONTAGUE et al., 2005). É importante notar que o tratamento pode variar de acordo com a etiologia da disfunção erétil. As de causa psicológica, o acompanhamento com psicólogo pode contribuir para melhor performance sexual, bem como as de origem pós-trauma, onde a cirurgia de revascularização pode melhorar em até 70% o quadro de disfunção erétil, ou até mesmo as de origem hormonal podem ser tratadas com reposição hormonal (HATZIMOURATIDIS et al., 2010). Porém, geralmente para as de ordem orgânica, o tratamento farmacológico pode ser eficaz.

Sendo assim, a abordagem terapêutica pode ser dividida em primeira, segunda ou de terceira linha de tratamentos. A primeira linha de tratamento recomendada são fármacos orais, os inibidores da enzima fosfodiesterase do tipo 5 (iPDE-5) (sildenafil, tadalafila, vardenafila) e acompanhamento com psicoterapeuta (SIMOPOULOS; TRINIDAD, 2013). Caso não haja efeito ou complicações com os efeitos adversos, pode ser considerada a segunda linha de tratamento, a autoinjeção intracavernosa ou administração intrauretral com fármacos vasodilatadores e relaxantes da musculatura lisa do corpo cavernoso, a exemplo dos análogos de prostaglandina E1, como o alprostadil. Levando em consideração a segunda linha de tratamento farmacológica, aproximadamente 46% dos pacientes descontinuam o tratamento (ALTHOF et al., 1989), por conta do desconforto associado a administração. Há também a possibilidade de tratamento com apomorfina administrada sublingual, que terá efeito de estimulação da regulação do sistema nervoso central, desencadeando o processo de ereção (NEVES et al., 2004). Há também a terceira linha de tratamento mais invasiva do que as outras, indicado para casos mais graves, que é o implante peniano (HATZIMOURATIDIS et al., 2010).

O início da comercialização no Brasil da primeira linha de tratamento para disfunção erétil, os iPDE-5, foi permitida em 1999 com o citrato de sildenafil. Com o passar do tempo, os outros inibidores foram liberados, tadalafila em 2004, o vardenafila em 2007 e em 2010 foi desenvolvido no Brasil, o lodenafila. O uso desses medicamentos melhora não somente o quadro de disfunção erétil, mas também a qualidade de vida de muitos indivíduos, uma vez que a administração é oral, não invasiva, e, a depender da dose e do fármaco pode ser ingerido em até horas antes do ato sexual. Porém esse tratamento pode promover alguns problemas no indivíduo, como dores de cabeça, distúrbios visuais, rinite, rubor e dispepsia (indigestão) (GOLDSTEIN et al., 2002). Esses efeitos adversos contribuem para a descontinuação do tratamento oral. Porém, há alta taxa de pacientes que não respondem a essa terapia, a exemplo de pacientes diabéticos, pacientes que apresentam disfunção endotelial, que está intimamente relacionada ao envelhecimento, e pacientes que passaram por prostatectomia respondem menos aos iPDE5 (BURNETT et al., 2018). É importante ressaltar que os pacientes podem fazer uso de outras alternativas, como os dispositivos mecânicos, a exemplo da vacuoterapia.

Adicionalmente, há precaução quanto ao uso de iPDE5 e outros fármacos, a exemplo dos anti-hipertensivos. Uma vez que é descrito a relação de alguns medicamentos anti-hipertensivos e o desenvolvimento de disfunção erétil, a exemplo de diuréticos, clonidina e β -bloqueadores (exceto nebivolol) (PAPATSORIS; KORANTZOPOULOS, 2006). Um dos mecanismos que podem levar a disfunção erétil é que esses fármacos podem reduzir a perfusão sanguínea no pênis, ocasionando redução da ereção. Além do mais, a utilização concomitante de iPDE5 e bloqueadores α -adrenérgicos é evitada e com nitratos orgânicos é impossibilitada, ao potencializar ambos seus efeitos, podendo causar hipotensão (KLONER, 2007). Porém, é descrito que bloqueadores do receptor de angiotensina e nebivolol (inibidor de receptor β 1-adrenérgico) podem melhorar a função sexual por inibir o mecanismo inflamatório e constritor da angiotensina II e aumentar a disponibilidade de óxido nítrico (TARUKALLO; RASYID, 2020). Dessa forma, há diferentes modulações dos anti-hipertensivos a depender da classe e do medicamento utilizado.

2.7. DISFUNÇÃO ERÉTEL, HIPERTENSÃO E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Como dito anteriormente, a disfunção erétil está associada a condições clínicas como a hipertensão arterial. Foi descrito que a prevalência de hipertensão mascarada é alta em pacientes com disfunção erétil, cerca de 37% (ATES et al., 2020). Segundo as Sociedades Europeias de Cardiologia e Hipertensão, a hipertensão mascarada é caracterizada por pontualmente apresentar valores da pressão arterial normal, entretanto com pressão arterial alta ambulatorial

ou domiciliar ao longo do dia (média de 24 horas $\geq 130 / 80$ mmHg) e está presente entre 10-17% da população, que apresentam também mais risco de doença cardiovascular do que os indivíduos normotensos (WILLIAMS et al., 2018). Sendo mais um indício de que a disfunção erétil está intimamente relacionada ao desenvolvimento de hipertensão.

Uma das principais preocupação sobre a regulação da pressão arterial é a ocorrência de hipertensão resistente. Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia a hipertensão resistente é caracterizada pela manutenção da pressão arterial acima das metas recomendadas de pacientes que fazem uso de ao menos três fármacos anti-hipertensivos de diferentes classes, incluindo um bloqueador do sistema renina-angiotensina, um bloqueador de canais de Ca^{2+} e um diurético (YUGAR-TOLEDO et al., 2020). Então, nesse grupo de pacientes há elevado consumo de medicamentos, e ainda assim o risco de doença cardiovascular prevalece, uma vez que não é controlada a níveis desejados a pressão arterial. Foi realizado um estudo que avaliou a prevalência de disfunção erétil em pacientes com hipertensão resistente (BOUTARI et al., 2016). Tendo observado que 66,9% dos pacientes com hipertensão resistente apresentaram disfunção erétil, destes, 73,5% caracterizada como severa ou moderada e o restante com disfunção erétil leve. Reforçando a relação entre o desenvolvimento de disfunção erétil e o quadro hipertensivo ou de uso de medicamentos anti-hipertensivos.

A hipertensão e disfunção erétil apresentam fatores de risco em comum incluindo a disfunção endotelial e aumento de espécies reativas de oxigênio, além disso os pacientes hipertensos tem maiores chances de desenvolver disfunção erétil (FELDMAN et al., 1994). E o contrário também já foi evidenciado, que paciente com disfunção erétil apresentam maiores chances de desenvolver hipertensão (SUN; SWINDLE, 2005). Além disso, sabe-se que a disfunção erétil em pacientes hipertensos aumenta o risco de doença arterial coronariana (CORDEIRO et al., 2012). Adicionalmente, há maior prevalência de fatores de risco para doenças cardiovasculares em homens que apresentam disfunção erétil (SELVIN; BURNETT; PLATZ, 2007). Esses dados em conjunto reforçam a ligação entre a disfunção erétil e doença cardiovascular.

É bem descrito que a hipertensão é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular, e que as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte em todo mundo. Dentre as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte prematura, responsável por aproximadamente 31% de mortes no mundo. A preocupação em reduzir mortalidade prematura é uma das prioridades mundiais, sendo meta no Plano Global de DCNT 2013-2020 (WHO, 2013). Logo, o desenvolvimento de

estratégias de diminuição da prevalência de doença cardiovascular é almejado em mundialmente.

É importante notar que quanto mais severo o quadro de disfunção erétil comparado a indivíduos não acometidos, maior é o risco de desenvolver doença isquêmica do coração, infarto, doença vascular periférica e morte (BANKS et al., 2013). Porém, é necessário compreender a participação do fator envelhecimento nas análises de correlação entre disfunção erétil e doenças cardiovasculares. Nesse sentido, é importante ressaltar que a disfunção erétil pode ser considerada um marcador de doença cardiovascular por anteceder em até 3 anos a doença arterial coronariana (THOMPSON et al., 2005). Dessa forma, a identificação de pacientes poderia auxiliar estratégias de intervenção prévia para o tratamento de doença cardiovascular. De maneira combinada, poderiam ser sugeridas mudanças no estilo de vida do paciente, adquirindo hábitos mais saudáveis, realização de exercícios físicos e acompanhamento médico para avaliar intervenções medicamentosas.

2.8. MODELO EXPERIMENTAL DE DISFUNÇÃO ERÉTEL ASSOCIADA A HIPERTENSÃO

Com o objetivo de elucidar características fisiológicas e novas abordagens terapêuticas para a disfunção erétil, metodologias pré-clínicas foram desenvolvidas. Nesse sentido, diversos modelos experimentais foram caracterizados para melhorar o entendimento sobre o quadro de disfunção erétil a respeito das diferentes etiologias. Logo, há diversos modelos experimentais dentre eles os modelos traumáticos, a exemplo de injúria no nervo cavernoso comprometendo a resposta erétil do animal; há modelos de disfunção erétil orgânica, a exemplo dos animais diabéticos, castrados e os ratos espontaneamente hipertensos (SHR)(CHUNG; DE YOUNG; BROCK, 2011).

Tendo em vista que a maioria dos pacientes desenvolvem disfunção erétil com o envelhecimento, e que a hipertensão é uma das comorbidades mais frequentes em indivíduos idosos e a forte relação entre hipertensão e disfunção erétil (MOREIRA et al., 2003a), o modelo experimental SHR torna-se uma estratégia interessante para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos de disfunção erétil. É válido ressaltar que os SHR são modelos utilizados classicamente para estudos de hipertensão essencial (CHIUEH; KOPIN, 1978), uma vez que por fatores genéticos esses animais desenvolvem a hipertensão e apresentam grande similaridade a hipertensão essencial desenvolvida em humanos (TRIPPODO; FROHLICH, 1981). De maneira interessante, os SHR também desenvolvem disfunção erétil, e essa descoberta foi elucidada por alguns ensaios como os citados a seguir.

A função erétil de animais SHR foi descrita a partir de ensaios de avaliação de pressão intracavernosa, nos quais observou-se menor pressão intracavernosa e menor responsividade a relaxamento promovido por doador de NO quando comparado ao grupo normotenso de mesma idade (BEHR-ROUSSEL et al., 2003). Tendo observado a menor resposta erétil desses animais, posteriormente, foi realizada a avaliação temporal do surgimento da disfunção erétil comparado as alterações vasculares nos animais SHR. Foi observado então que, a diferença na função erétil observada entre os SHR e o grupo controle antecede a mudança na pressão arterial média e estabelecimento da hipertensão arterial nesse modelo animal (BEHR-ROUSSEL et al., 2004). Sugerindo que o quadro de disfunção erétil antecede a hipertensão em SHR, de modo similar ao que ocorre no humano, em que a disfunção erétil pode anteceder o surgimento de doença cardiovascular.

Adicionalmente, um estudo foi realizado para analisar o relaxamento promovido por NO neurogênico em animais SHR e foi observado a diminuição do relaxamento do corpo cavernoso promovido por NO neurogênico (via nitrérgica, fibras NANC) em comparação a controle normotenso de mesma idade (USHIYAMA et al., 2004). Esse estudo evidenciou também a menor resposta erétil dos animais SHR em comparação ao grupo controle. Levando esses dados em consideração, os animais SHR são modelos experimentais para estudos de disfunção erétil. Então, a utilização de animais SHR em estudos pré-clínicos podem contribuir para a avaliação de potenciais novas moléculas bioativas sobre a fisiologia do corpo cavernoso e dessa forma, podem elucidar a descoberta de novas terapias para disfunção erétil.

2.9. PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS

O desenvolvimento de estratégias para conhecer moléculas biologicamente ativas produzidas pelas plantas tornou possível o avanço no tratamento de várias doenças (HARVEY, 2008). Diversos fármacos amplamente utilizados, inicialmente foram obtidos de plantas, a exemplo da papaverina que é um alcaloide com ação vasodilatadora e relaxante de musculatura lisa, tendo atividade também sobre a função erétil (DIEDERICHS et al., 1991). Uma avaliação retrospectiva analisou a utilização de produtos naturais ou seus derivados com o percentual de medicamentos aprovados. Destes, para o tratamento de disfunção sexual masculina quatro medicamentos foram aprovados entre 1981-2010, e todos foram classificados como obtido por síntese completa, porém o grupo farmacóforo provem de produto natural e que mimetiza um produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Nesse sentido, a bioprospecção de produtos naturais afim de buscar novos fármacos é uma área atrativa das ciências. Vários são os grupos de metabólitos secundários de plantas que

são estudados a fim de descrever sua ação em sistemas biológicos, e assim, gerarem novos fármacos em potencial. Dentre os grupos de metabólitos secundários existem as cumarinas, que apresentam atividade biológica e assim tem potencial para o desenvolvimento de novas terapias (KONTOGIORGIS; DETSI; HADJIPAVLOU-LITINA, 2012).

O termo cumarina representa um largo grupo de compostos que apresentam em sua estrutura química o núcleo 2H-1-benzopirano-2-ona (GRAY; WATERMAN, 1978). Essa estrutura química pode ser combinada, resultando em diferentes derivados e subclasses de cumarinas. O derivado da fusão de uma cumarina simples a outro composto heterocíclico, por exemplo, pode ser classificado como piranocumarinas, furanocumarinas e fenilcumarinas (MATOS et al., 2015). As cumarinas já foram isoladas de diversas espécies de plantas, em mais de 40 famílias diferentes. Fato que evidencia a ampla distribuição e ocorrência desses compostos químicos na natureza. Adicionalmente, diversas atividades biológicas já foram atribuídas as cumarinas, como por exemplo, atividade anti-inflamatória (KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2005), antioxidante (KOSTOVA, 2006) e relaxante de corpora cavernosa (CHEN et al., 2000). Além disso, as cumarinas mais comumente encontradas na natureza são as cumarinas simples, furocumarinas e piranocumarinas (MATOS et al., 2015).

2.10. BRAILINA

A piranocumarina brailina teve sua fórmula molecular descrita em 1949 por Anet e colaboradores (ANET; HUGHES; RITCHIE, 1949), por meio de estudos com a planta *Flindersia brayleyana* os quais a descreveram como 6-metoxi-7,8-(2',2'-dimetilpirano-bf,6')cumarina. A estrutura química é ilustrada na **FIGURA 4**. Poucos estudos foram realizados até o momento avaliando o efeito biológico dessa cumarina isolada, a seguir será tratado sobre os estudos publicados até o momento.

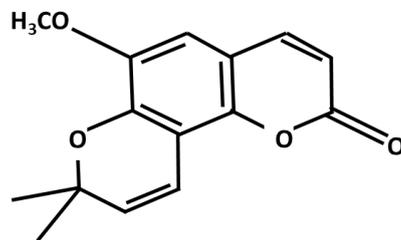


FIGURA 4. Estrutura química da cumarina brailina.

Fonte: Autora.

Em 1998, foi demonstrado a ação anti-plaquetária de compostos extraídos da planta *Toddalia asiatica*, por meio do método de turbidimetria (TSAI et al., 1998). Dentre os

compostos extraídos, havia cumarinas, das quais apenas a brailina (100 µg/ml) foi capaz de impedir a agregação de plaquetas induzida por colágeno e fator de agregação plaquetária. Sugerindo que a brailina, como composto isolado pode apresentar atividade farmacológica.

Em 2014, foram estudados compostos extraídos desta mesma planta, a *Toddalia asiática*, e mostrou-se que alguns compostos, inclusive a brailina, apresentaram atividade inibidora de PDE-4D2 humana (LIN et al., 2014). Nesse estudo os autores realizaram uma modelagem molecular para avaliar a possível interação dos compostos com a enzima PDE-4D *in silico*, além de avaliar a inibição enzimática *in vitro*. Sendo assim, esse estudo indicou que a brailina pode ser um potente inibidor da PDE-4 e que essa molécula pode ser promissora para desordens no organismo que envolvem a participação dessa classe enzimática.

Em 2017, foi avaliado a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e imunomodulatória da brailina (ESPÍRITO-SANTO et al., 2017). De maneira concentração dependente a brailina diminuiu a atividade de macrófagos ativados. Adicionalmente, foi verificado por modelagem molecular que a brailina pode apresentar interações que sugerem atividade de ligante de receptor glicocorticoide. Dessa forma, os resultados desse estudo indicam que a brailina também pode apresentar atividade farmacológica em desordens envolvidas com processos inflamatórios.

Adicionalmente aos estudos descritos anteriormente que avaliaram as ações da brailina isolada, outros estudos foram performados com extratos de planta que apresentavam em sua composição a brailina (MINGORANCE; ANDRIANTSITOHAINA; ALVAREZ DE SOTOMAYOR, 2008; RAKOTOARISON et al., 2003; RALAY RANAIVO et al., 2004), sendo então um indício de que a brailina isolada pode influenciar na resposta biológica observada dos extratos estudados, como descrito a seguir.

O estudo de Rakotoarison e colaboradores (2003) mostraram o efeito vasorrelaxante do extrato hidroalcoólico da casca do tronco de *Cedrelopsis grevei* em anéis de aorta pré-contraídos com noradrenalina. Esse extrato continha diferentes cumarinas e outros compostos fitoquímicos, dentre as quais estava inclusa a brailina, identificada por cromatografia em camada delgada. Porém, nenhum estudo com a cumarina brailina isolada havia sido realizado para investigar a real ação desta sobre a vasculatura ou atividade cardíaca. Então, nosso grupo de pesquisa realizou ensaios com artéria mesentérica isolados de ratos Wistar e observou efeito vasorrelaxante da brailina envolvendo a via NO-cGMP e cAMP (em processo de submissão).

Similarmente, em 2004, Ralay Ranaivo e colaboradores (RALAY RANAIVO et al., 2004) demonstraram a ação hipotensora do extrato dessa mesma planta, a *C. grevei*, em ratos normotensos, através de administração oral. Observou-se então, que o extrato induziu aumento

do relaxamento mediado por óxido nítrico em artérias de condutância e resistência, indicando a ação farmacológica dos compostos presentes no extrato dessa planta no sistema cardiovascular.

Outro estudo, também utilizando extrato, dessa mesma planta *C. grevei*, rico em cumarinas, realizado por Mingorance e colaboradores (2008) observaram que houve prevenção da disfunção endotelial de anéis de aorta e arteríolas mesentéricas em ratos senis tratados diariamente via intragástrica, por oito semanas, com o extrato; assim como a prevenção do aumento da pressão sanguínea sistólica quando comparado ao grupo não tratado. Indicando assim, que os compostos presentes nesse extrato apresentaram atividade preventiva de disfunção endotelial e ação anti-hipertensiva.

Levando esses dados em consideração, a brailina já apresentou atividade anti-plaquetária, inibidora de PDE4, anti-inflamatória, antinociceptiva e imunomodulatória. Em adição, esteve presente em extratos caracterizados por apresentar atividade vasorelaxante, hipotensora, preventiva de disfunção endotelial e ação anti-hipertensiva. Adicionalmente, foi descrita a ausência de citotoxicidade de brailina em linhagens cancerígenas humanas (SHOKOOHINIA et al., 2014). É importante ressaltar que a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (2000, p. 217) classificou as cumarinas como grupo de compostos que não são classificados com ação carcinogênica em humanos. Assim, esses dados contribuem para o desenvolvimento de estudos farmacológicos utilizando a cumarina brailina.

Quanto a atividade de cumarinas na função erétil, já foi descrito que a cumarina ostol apresenta efeito em tecido erétil de modelo experimental. Em 2000 foi publicado por Chen e colaboradores um estudo que utiliza a cumarina ostol sobre a contratilidade de corpos cavernosos de coelho e foi observado a ação relaxante dependente da via NO-cGMP, aumentando os níveis dos mensageiros secundários cAMP e/ou cGMP. Esse estudo é um indício de que cumarinas podem agir em tecido erétil de animais, promovendo a melhora da função erétil. Em concordância, foi reportado um relato de caso sobre priapismo durante tratamento oral de acenocoumarol para tratar trombose (TOULOUPIDIS et al., 2004), essa cumarina, assim como a varfarina é utilizada na clínica como anticoagulante. Assim, já é reportado que substâncias com ação anticoagulante alterem a função erétil.

Sendo assim, levando em consideração o conhecimento da literatura acerca das atividades farmacológicas de cumarinas, inclusive da brailina citados acima, pode-se gerar a hipótese de que a brailina é capaz de relaxar a corpora cavernosa apresentando potencial terapêutico para tratamento da disfunção erétil associada à hipertensão.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito relaxante da cumarina brailina em corpora cavernosa e consequentemente seu potencial terapêutico para o tratamento da disfunção erétil associado à hipertensão.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efeito da brailina na corpora cavernosa de ratos;
- Investigar a participação da via NO/sGC e AC/PKA no mecanismo de ação envolvido no relaxamento do corpo cavernoso induzido pela brailina;
- Avaliar a influência da brailina em contração e relaxamento induzidos por neurotransmissores e doadores de óxido nítrico;
- Avaliar o efeito da brailina em corpos cavernosos de animais hipertensos/com disfunção erétil (SHR).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Para todos os protocolos experimentais foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) adultos (11-15 semanas) da linhagem Wistar ou espontaneamente hipertensos (SHR). Os ratos foram provenientes do Biotério do Laboratório de Neurociências, alocado no Instituto de Ciências da Saúde, na Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA). Os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração padrão, mantidos em ambiente refrigerado com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h cada, luzes acessas às 6h e desligadas às 18h) controlados. Os ensaios experimentais foram conduzidos de acordo com o Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. A metodologia planejada está vinculada ao projeto aprovado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICS/UFBA, número do protocolo 130/2017.

4.2. SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de L(-) fenilefrina (FEN), norepinefrina (NE), cloridrato de acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (NPS) solubilizados em água destilada, N-omega-Nitro-L-arginina metil ester hidrocloreto (L-NAME), 1H-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), KT5823, SQ22536, KT5720, cloridrato de sildenafil (SIL), quando necessário, solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) ou Cremophor EL, todas as substâncias foram obtidas da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, Missouri, United States).

4.3. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA BRAILINA

A cumarina brailina foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. Eudes da Silva Velozo, coordenador do Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica (LAPEMM), situado na Faculdade de Farmácia na Universidade Federal da Bahia. A brailina foi extraída, identificada e separada com pureza de 98%, o processo de obtenção foi descrito em Espírito-Santo e colaboradores em 2017. Para a preparação das soluções estoques, a brailina foi solubilizada em cremophor (numa proporção de 2:1) e diluída em água destilada, de modo a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental. O agente solubilizante na concentração utilizada não apresentou atividade biológica em ensaios preliminares.

4.4. SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as soluções de Krebs-bicarbonato e despolarizante de Tyrode com KCl 80mM. Para a preparação das soluções fisiológicas foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fosfato de sódio mono-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e fosfato de potássio (KH_2PO_4), todas as substâncias foram obtidas da VETEC Química Fina[®] (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). As tabelas 1 e 2 mostram as composições das soluções utilizadas:

Tabela 1: Composição da solução Krebs-bicarbonato.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	117
KCl	5,36
KH_2PO_4	1,03
NaHCO_3	25
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,57
Glicose	11,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5

Fonte: (BAILEY; ONG, 1978)

Tabela 2: Composição de solução de Tyrode despolarizante KCl 80mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	82,3
KCl	80,0
NaH_2PO_4	0,42
NaHCO_3	10,0
MgCl_2	1,05
Glicose	5,6
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,0

Fonte: Adaptado (TANAKA et al., 1999).

4.5. PREPARAÇÃO DOS CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATO

Para todos os protocolos experimentais foram utilizados os corpos cavernosos de ratos da linhagem Wistar e SHR. Os ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida o pênis foi retirado na região de inserção da crura e colocado em solução resfriada (~14°C) de Krebs-bicarbonato, cuja composição é detalhada na TABELA 1. Posteriormente foi realizada a retirada de tecidos adjacentes aos corpos cavernosos, incluindo veia dorsal peniana e corpo esponjoso envolvendo a uretra. Cada pênis é constituído de dois segmentos de corpos cavernosos, os quais foram separados obtendo-se as tiras direita e esquerda seccionadas a 1cm de comprimento cada.

Para o registro das contrações isométricas, os segmentos de corpos cavernosos devidamente segmentados foram mantidos em cubas de banho de órgão isolado (AVS Projetos, SP, Brasil) (FIGURA 5). Na cuba, os segmentos foram mantidos em 10 mL de solução de Krebs-bicarbonato, a temperatura de 37°C, gaseificados em solução carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), para isso foram suspensos em hastes metálicas e conectados a um transdutor de força (AVS Projetos, SP, Brasil). A tensão detectada no transdutor de força foi amplificada (Amplificador AECAD04HW, AVS Projetos, SP, Brasil) e registrada por sistema de aquisição de dados (Software AQCAD) instalado no computador. A tensão inicial de cada tecido foi ajustada para 0,5 g no período de estabilização por 60 min, no qual a cada 15 min foi realizada a troca da solução de Krebs-bicarbonato, para prevenir a interferência de metabólitos. Após o período de estabilização foi realizado o teste de viabilidade, no qual a solução de Krebs-bicarbonato foi trocada por uma solução despolarizante de Tyrode KCl 80mM, cuja composição detalhada é apresentada na TABELA 2.

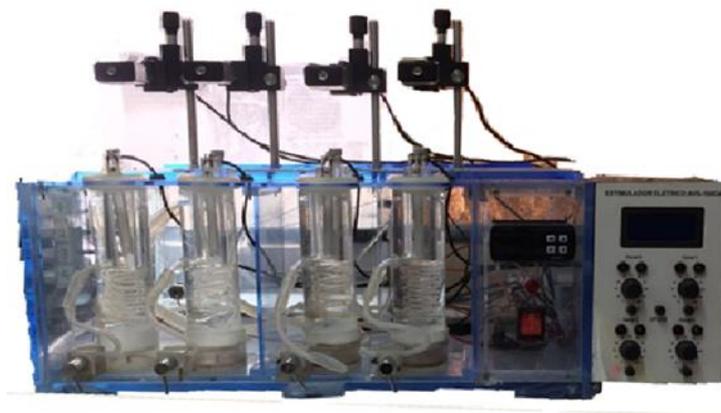


FIGURA 5. Banho para órgão isolado utilizado para os experimentos com corpo cavernoso de ratos.

4.6. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.6.1. Avaliação da viabilidade tecidual

A resposta contrátil do tecido foi mantida por 20 min, em seguida foi realizada a troca por solução de Krebs-bicarbonato, quantas vezes necessário, para o retorno da tensão basal, após 30 min, aproximadamente. Foram considerados viáveis os tecidos que alcançaram ao menos 50 mg de contração com solução de Tyorde a KCl80mM. Após o teste de viabilidade foram realizados os ensaios experimentais posteriores.

4.6.2. Avaliação do efeito relaxante de brailina

Este protocolo foi desenvolvido para avaliar o efeito relaxante da brailina em segmentos de corpos cavernosos isolados de ratos Wistar ou espontaneamente hipertensos (SHR). Após a análise da viabilidade tecidual, realizou-se a adição de concentrações cumulativas da brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M), com intervalos de 20 minutos para cada concentração, nos segmentos de corpos cavernosos viáveis, pré-contraídos com FEN 10^{-5} M. O esquema representativo do protocolo experimental é mostrado na **FIGURA 6**. Como forma de excluir o viés de que o agente solubilizante utilizado, cremophor 50% (m/m) seria responsável pelo relaxamento, foi comparado a tensão isométrica obtida após a incubação do veículo da concentração 10^{-4} M e o efeito relaxante observado quando na presença de brailina.

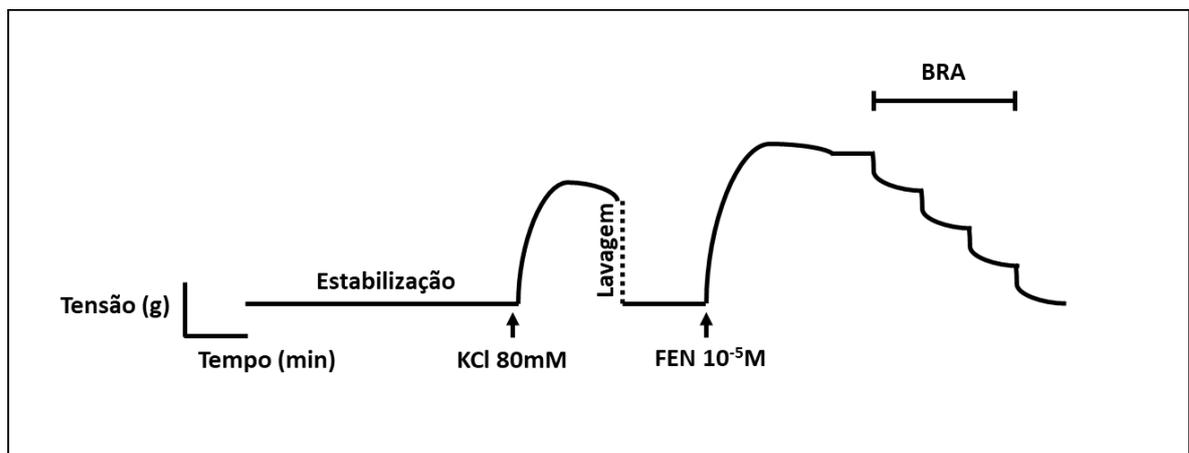


FIGURA 6. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina.

4.6.3. Avaliação do efeito da brailina sobre o tônus basal

O objetivo desse protocolo foi avaliar se a brailina apresenta efeito sobre o tônus muscular basal do tecido cavernoso. Para isso, a brailina foi adicionada em tiras de corpo cavernoso de animais wistar, sobre o tônus basal, ou seja, na tensão de estabilização. Após o teste de viabilidade com solução despolarizante de Tyrode com KCl 80mM como descrito anteriormente, houve a troca de solução de Krebs-bicarbonato até as tiras atingirem o tônus basal (em torno de 0,5g), depois de 30 minutos de estabilização, foi realizada a adição de brailina 3×10^{-5} M e observado o seu efeito durante 30 min, com a finalidade de avaliar os efeitos da brailina sobre o tônus muscular basal. A análise desse protocolo foi realizada a partir da comparação entre a tensão isométrica de tiras de corpo cavernoso antes do período de incubação com a brailina e a tensão isométrica após o período de 30 min com brailina. O protocolo experimental é mostrado na **FIGURA 7**.

4.6.4. Avaliação da influência de brailina na contração induzida por fenilefrina

Este experimento foi desenvolvido para avaliar se a brailina apresenta indícios de alterar a maquinaria contrátil. A análise desse protocolo teve como base a comparação entre a segunda contração por FEN 10^{-5} M em tiras sem a incubação com brailina e tiras que foram incubadas por 30 min com brailina (protocolo anterior). Dessa forma, foi possível analisar se a presença de brailina (3×10^{-5} M) influencia menor resposta contrátil a FEN 10^{-5} M, como observado no esquema da **FIGURA 7**.

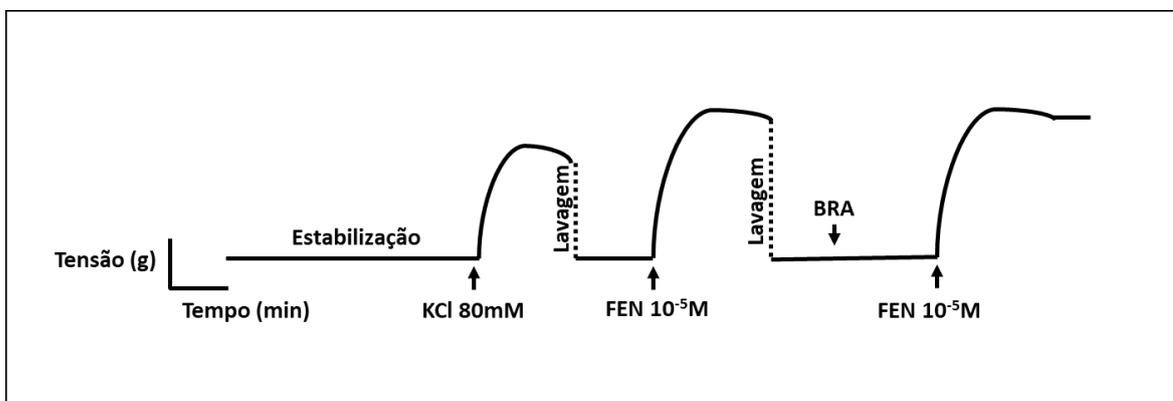


FIGURA 7. Representação esquemática do protocolo experimental da avaliação da influência da brailina no tônus basal e na habilidade contrátil do corpo cavernoso isolado de rato.

4.6.5. Avaliação do efeito relaxante de brailina em segmentos pré-contraídos por solução despolarizante

Levando-se em consideração que a realização dos ensaios citados anteriormente demonstrou o efeito relaxante da brailina, foram realizados ensaios para esclarecer os mecanismos pelos quais a brailina foi capaz de promover esses efeitos em tiras de corpo cavernoso isolado. Então, foi realizado o protocolo de avaliação do efeito relaxante de brailina em tiras de corpos cavernosos pré-contraídas por solução despolarizante com elevada concentração de K^+ , a solução de Tyrode a KCl 80mM. Para isso, após o período de estabilização inicial, o meio nutritivo de cada preparação foi trocado pela solução de Tyrode com KCl 80 mM e a brailina foi adicionada cumulativamente às cubas nas concentrações de 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M, com intervalos de 20 minutos para cada concentração. O protocolo experimental é esquematizado na **FIGURA 8**. A análise do protocolo foi realizada ao comparar o relaxamento induzido por brailina em tiras pré-contraídas por fenilefrina e por solução despolarizante, a fim de avaliar se a elevada concentração de K^+ interfere no relaxamento induzido por brailina.

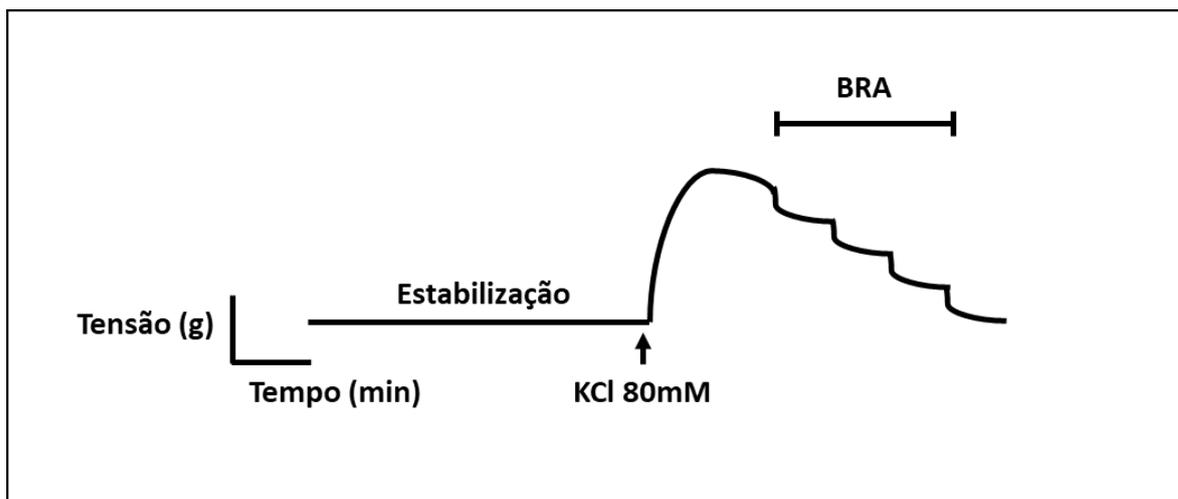


FIGURA 8. Esquema representativo do protocolo experimental do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso pré-contraídos com KCl 80mM.

4.6.6. Avaliação do papel da via NOS/sGC/PKG no relaxamento induzido por brailina

O objetivo deste protocolo experimental foi avaliar a participação da via de sinalização que envolve a enzima óxido nítrico sintase (NOS), ciclase de guanilil solúvel (sGC) e a proteína cinase G (PKG) no relaxamento induzido por brailina. Para isso, após o período de estabilização e teste de viabilidade com solução de Tyrode com KCl 80mM, troca de solução por Krebs-bicarbonato e retorno da tensão da basal, foi seguido o protocolo. Em diferentes preparações foi adicionado nas cubas o inibidor da NOS, o N-omega-Nitro-L-arginina metil ester hidrocloreto (L-NAME) 10^{-4} M (GUR et al., 2016), ou o inibidor da sGC, o 1H-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) 10^{-5} M (YOUSIF; BENTER, 2007) ou o inibidor da PKG, o KT5823 a 10^{-6} M (PAUVERT et al., 2003), permanecendo com os mesmos até o final do experimento. Passados 30 minutos da incubação com os inibidores, foi induzida uma nova contração tônica com FEN 10^{-5} M e, em seguida, uma curva concentração-resposta para a brailina foi obtida. A curva foi realizada com a adição cumulativa de brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M), com intervalos de 20 minutos para cada concentração. A representação esquemática do protocolo é mostrada na **FIGURA 9**. A avaliação deste protocolo foi realizada comparando o efeito relaxante de brailina em tiras pré-contraídas com fenilefrina na ausência e na presença dos inibidores citados.

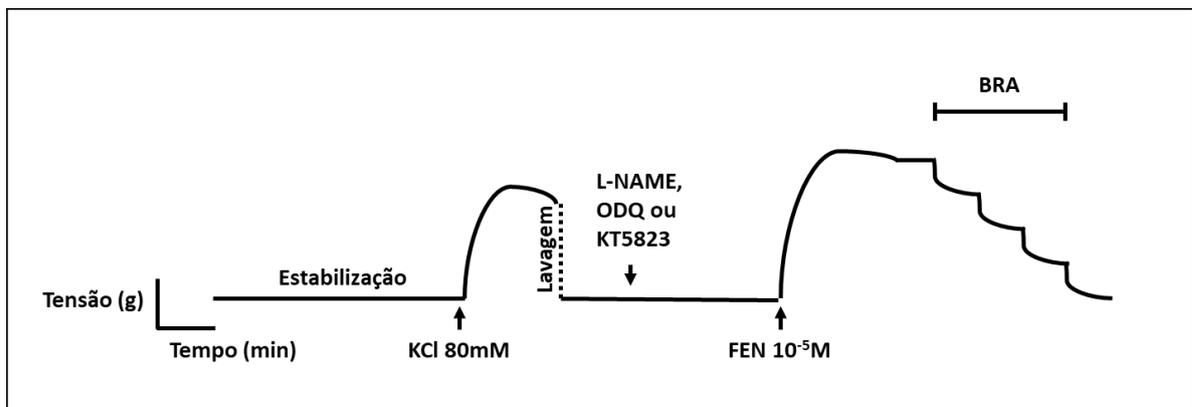


FIGURA 9. Representação esquemática do protocolo de avaliação da participação das enzimas NOS, sGC e PKG no relaxamento promovido por brailina em tiras de corpos cavernosos de ratos pré-contraídos com fenilefrina.

4.6.7. Avaliação do papel da via AC/PKA no relaxamento induzido por brailina

Este protocolo experimental foi realizado no intuito de avaliar a participação da via de sinalização que envolve a enzima adenilato ciclase (AC) e a proteína cinase A (PKA) no relaxamento induzido por brailina. Para isso, após o período de estabilização e teste de viabilidade com solução de Tyrode com KCl 80mM, troca de solução por Krebs-bicarbonato e retorno da tensão da basal, foi seguido o protocolo. Em diferentes preparações foi adicionado nas cubas o inibidor da AC, o SQ22536 10^{-5} M (DE OLIVEIRA et al., 2019), ou o inibidor da PKA, o KT5720 10^{-6} M (ANDRÉ et al., 2003), permanecendo com estes até o final do experimento. Passados 30 minutos da incubação com os inibidores, foi induzida uma nova contração tônica com FEN 10^{-5} M e, em seguida, uma curva concentração-resposta para a brailina foi obtida. A curva foi realizada com a adição cumulativa de brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M), com intervalos de 20 minutos para cada concentração. A representação esquemática do protocolo é mostrada na **FIGURA 10**. De maneira similar ao protocolo citado anteriormente, a avaliação deste protocolo foi realizada comparando o efeito relaxante de brailina em tiras pré-contraídas com fenilefrina na ausência e na presença dos inibidores citados, a fim de verificar se a inibição dessas enzimas modifica o efeito relaxante de brailina.

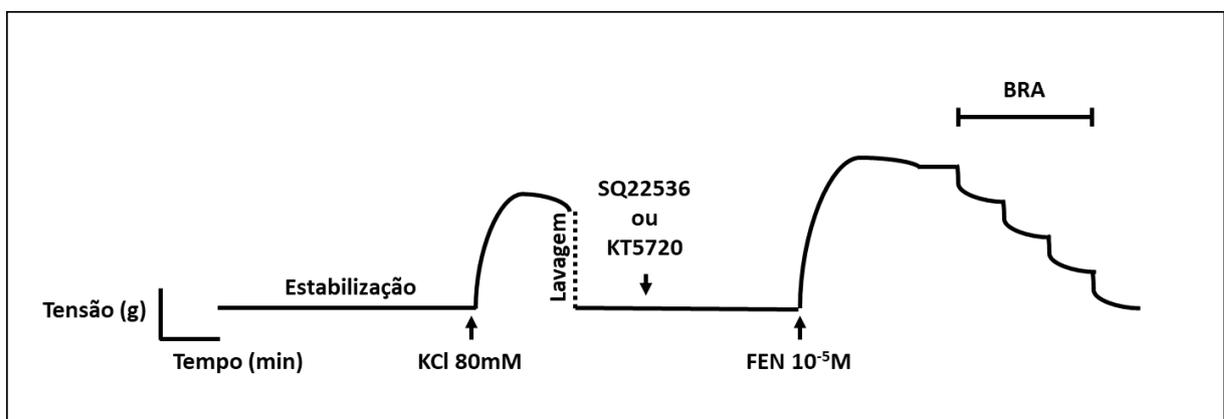


FIGURA 10. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina.

4.6.8. Comparação entre o efeito relaxante de inibidor de fosfodiesterase e o efeito induzido por brailina

Este protocolo foi desenvolvido para comparar o efeito relaxante induzido por inibidor de fosfodiesterase com potencial efeito relaxante da brailina em segmentos de corpos cavernosos isolados de ratos. Para alcançar esse objetivo foi utilizado o citrato de sildenafil que é um inibidor da fosfodiesterase tipo 5, e observado seu efeito relaxante. Após a estabilização, a solução de Krebs-bicarbonato foi trocada por uma solução de Tyrode com KCl 80mM até alcançar o platô da resposta contrátil, posteriormente, as preparações foram submetidas à uma nova estabilização, no qual a solução de Krebs-bicarbonato foi trocada até que a tensão da tira retornasse aos valores basais com tensão de repouso (0,5g). Em seguida foi realizada a contração com FEN 10^{-5} M e depois de 15-20min, realizou-se a adição de concentrações cumulativas do sildenafil (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M)(BASSIOUNI et al., 2019), alcançando a estabilização com intervalos de 20 minutos para cada concentração. O esquema representativo do protocolo experimental é mostrado na **FIGURA 11**. Após a observação do efeito relaxante de sildenafil, houve a comparação do efeito induzido por sildenafil e brailina quando testados na mesma concentração.

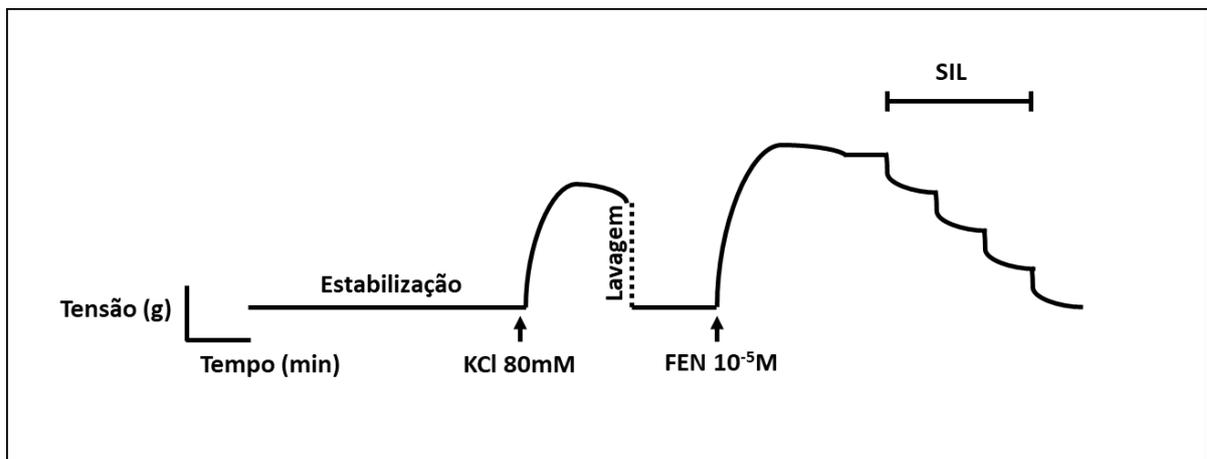


FIGURA 11. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante de brailina em tiras de corpo cavernoso de ratos pré-contraídos com fenilefrina.

4.6.9. Avaliação da influência de brailina no relaxamento promovido por doador de óxido nítrico

O objetivo deste protocolo foi avaliar se brailina seria capaz de influenciar o relaxamento induzido por ativador da via NO/GMPc/PKG. Então foi verificada a influência de brailina (3×10^{-5} M) no relaxamento promovido por doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (NPS). Após o período de estabilização, a solução de Krebs-bicarbonato foi trocada por uma solução de Tyrode com KCl 80mM até alcançar o platô da resposta contrátil, posteriormente, as preparações foram submetidas à uma nova estabilização, no qual a solução de Krebs-bicarbonato foi trocada até que a tensão da tira retornasse aos valores basais com tensão de repouso (0,5g). Posteriormente foi realizada a verificação da resposta contrátil a FEN 10^{-5} M como descrito anteriormente, seguidamente, em diferentes preparações algumas tiras foram incubadas com brailina (3×10^{-5} M) enquanto outras tiras não. Passados os 30min de incubação foi induzida uma segunda contração de FEN 10^{-5} M por 15 a 20 minutos e adicionadas as concentrações cumulativas do NPS (10^{-10} – 10^{-4} M) (SALAHDEEN et al., 2015) à cuba. Como medida de diminuição do número de animais utilizados na experimentação, as tiras de corpos cavernosos utilizadas para esse protocolo são continuação do esquema mostrado na **FIGURA 12** sem prejuízo sobre a avaliação do efeito relaxante.

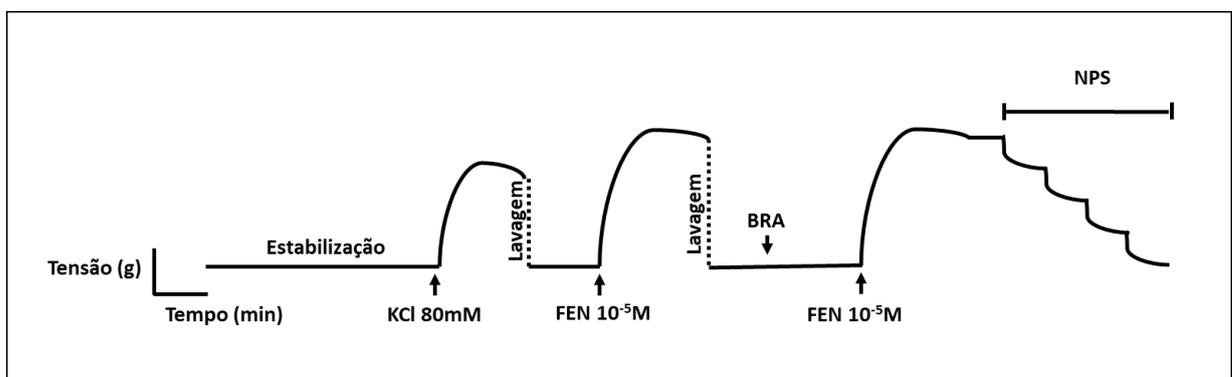


FIGURA 12. Representação esquemática do protocolo de avaliação da ação de brailina na tensão basal de tiras de corpos cavernosos, na contração induzida por fenilefrina, bem como sua participação no relaxamento promovido por NPS em tiras de corpos cavernosos de ratos.

4.6.10. Avaliação da influência de brailina na contração induzida por norepinefrina

O objetivo deste protocolo foi avaliar se brailina seria capaz de influenciar a contração induzida por neurotransmissor da via simpática, a norepinefrina (NE). Após o período de estabilização, a solução de Krebs-bicarbonato foi trocada por uma solução de Tyrode com KCl 80mM até alcançar o platô da resposta contrátil, posteriormente, as preparações foram submetidas à uma nova estabilização, no qual a solução de Krebs-bicarbonato foi trocada até que a tensão da tira retornasse aos valores basais com tensão de repouso (0,5g). Posteriormente foi realizada a verificação da resposta contrátil a FEN 10^{-5} M como descrito anteriormente, seguidamente, em diferentes preparações algumas tiras foram incubadas com brailina (3×10^{-5} M) enquanto outras tiras não. Passados os 30min de incubação foi adicionado cumulativamente NE (10^{-10} – 10^{-4} M)(BECKER et al., 2001; OGER et al., 2009). Foi realizada a comparação entre a contração induzida por NE em tiras expostas e não expostas a brailina. A representação esquemática do protocolo é mostrada na **FIGURA 13**.

4.6.11. Avaliação da influência de brailina no relaxamento induzido por acetilcolina

O objetivo deste protocolo foi avaliar se brailina seria capaz de influenciar o relaxamento induzido por neurotransmissor da via colinérgica, a acetilcolina (ACH). Para este protocolo experimental as tiras de corpo cavernoso foi incubadas com brailina (3×10^{-5} M) por 30min. Posteriormente as tiras foram contraídas com NE (10^{-10} – 10^{-4} M) e após o período de 20 a 30 min, foi adicionado cumulativamente ACh (10^{-10} – 10^{-4} M) (SALAHDEEN et al., 2015). Foi realizada a comparação entre o relaxamento promovido por ACh em tiras expostas e não expostas a brailina. A representação esquemática do protocolo é mostrada na **FIGURA 13**. Como medida de diminuição do número de animais utilizados na experimentação, as tiras de corpos cavernosos utilizadas para esse protocolo são continuação do protocolo citado acima, sem prejuízo sobre a avaliação do efeito relaxante.

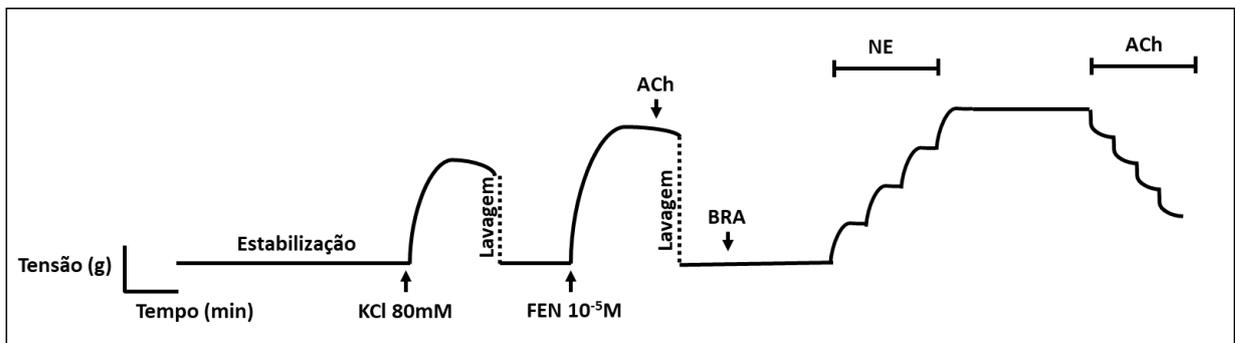


FIGURA 13. Esquema representativo do protocolo experimental para avaliação da influência de brailina na contração induzida por NE e no relaxamento induzido por ACh.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado utilizando o programa OpenEpi versão 3 (Massachusetts Institute of Technology, EUA). O tamanho da amostra para comparar duas médias foi igual a 5 amostras por grupo, tendo como base o poder do estudo de 95% e intervalo de confiança de 95%.

Os dados obtidos das medições experimentais (tensão em gramas) foram expressos em percentagem de relaxamento, considerando que o valor da contração induzida por fenilefrina ($10\mu\text{M}$) representa 0% de relaxamento. Em seguida foi gerado gráfico de barras através do programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) representando os grupos em função da percentagem de relaxamento. Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão da média (e.p.m.) de cada grupo experimental. A análise estatística para comparar os grupos experimentais de animais Wistar e/ou SHR foi feita utilizando teste t de Student pareado ou não pareado, quando apropriado. Quanto à inferência estatística dos resultados obtidos, foram considerados significantes valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. BRILINA INDUZ EFEITO RELAXANTE EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS WISTAR

A cumarina brailina teve seu efeito investigado e foi possível observar que a brailina induz efeito relaxante em corpo cavernoso isolado de rato. Foi verificada a resposta relaxante do corpo cavernoso induzida por brailina em tiras pré-contraídas por ligante de receptor $\alpha 1$ -adrenérgico. Foi verificado que o veículo utilizado não é responsável pelo efeito relaxante observado ($E_{BRA10^{-4}M} = 92,9 \pm 9,4$; $E_{Veículo10^{-4}M} = 17,4 \pm 8,1$) (**FIGURA 14**). Adicionalmente, foi verificado que a brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) é capaz de induzir relaxamento importante em corpo cavernoso isolado de rato wistar de maneira concentração-dependente ($E_{3 \times 10^{-4}M} = 115,1\% \pm 8,7$; $n=5$) (**FIGURA 15**).

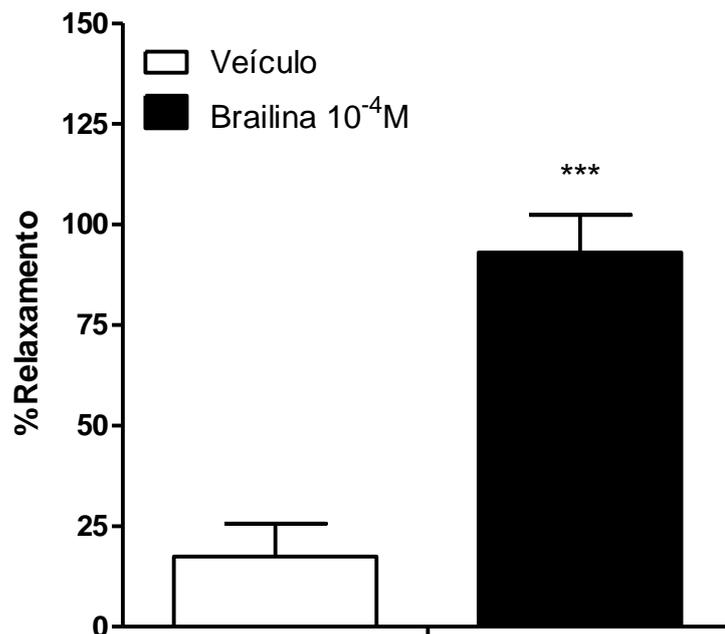
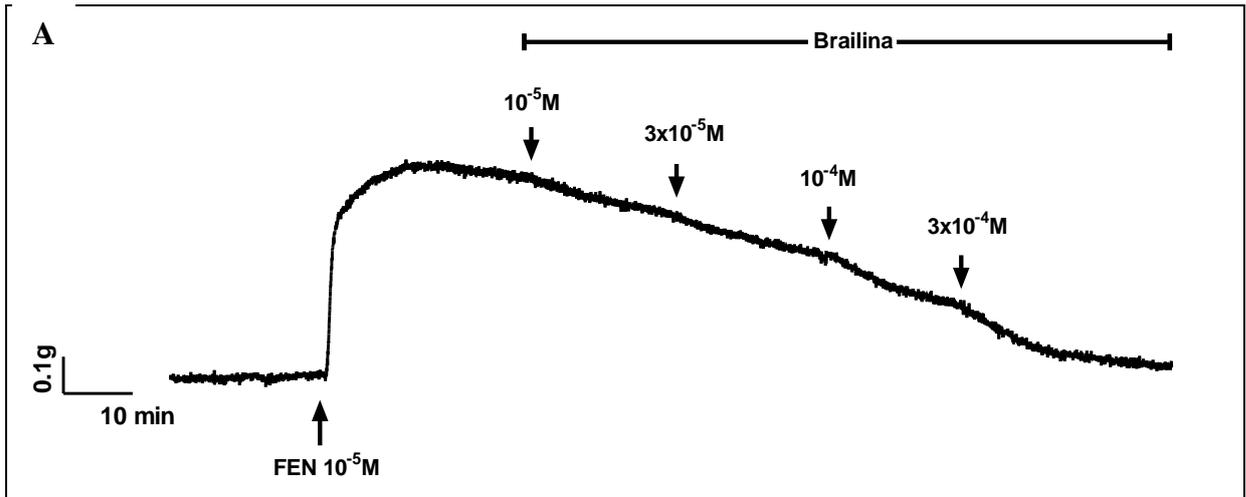


FIGURA 14. Veículo não é responsável pelo efeito relaxante observado da brailina. Gráfico de barras mostrando que o veículo não é responsável pelo efeito relaxante induzido por brailina $10^{-4}M$. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a contração com FEN $10^{-5}M$ considerada a 0% de relaxamento. Foi realizado teste t de Student não-pareado para comparar o grupo veículo e brailina, *** $p < 0,001$. Todos os grupos, $n=5$.



B

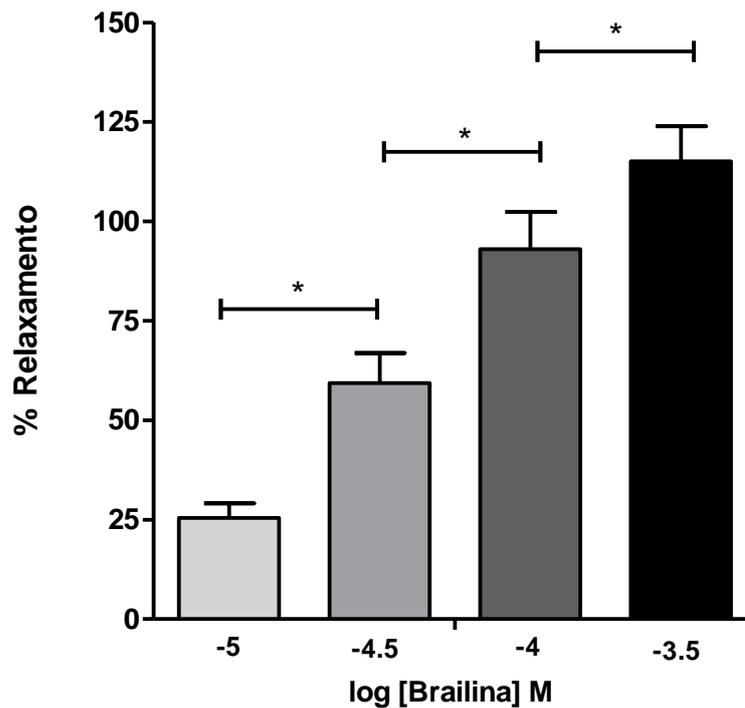


FIGURA 15. Efeito relaxante da cumarina brailina em tiras de corpos cavernosos isolados de ratos wistar. Em A, registro original mostrando o efeito relaxante de brailina adicionada cumulativamente (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) em tira de corpo cavernoso isolado de rato wistar, pré-contraído por FEN 10^{-5} M. Em B, gráfico de barras mostrando o efeito relaxante concentração-dependente de brailina adicionadas cumulativamente às preparações em banho de órgãos (n=5). Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a contração com FEN 10^{-5} M considerada 0% de relaxamento. Foi realizado teste t de Student pareado para comparar o efeito das concentrações de brailina, * $p < 0,05$.

5.2. BRAILINA NÃO ALTERA O TÔNUS MUSCULAR BASAL DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS WISTAR

Na

FIGURA 16 é mostrado que a brailina na concentração de $3 \times 10^{-5} \text{M}$ não apresenta efeito significativo sobre a tensão basal do tecido. As médias da tensão basal foi de $0,058 \pm 0,025 \text{ g}$ na ausência de brailina, enquanto após o período de incubação a tensão foi $0,056 \pm 0,025 \text{ g}$. Indicando que a brailina nessa concentração precisa de um estímulo contrátil prévio para desencadear uma resposta relaxante do corpo cavernoso.

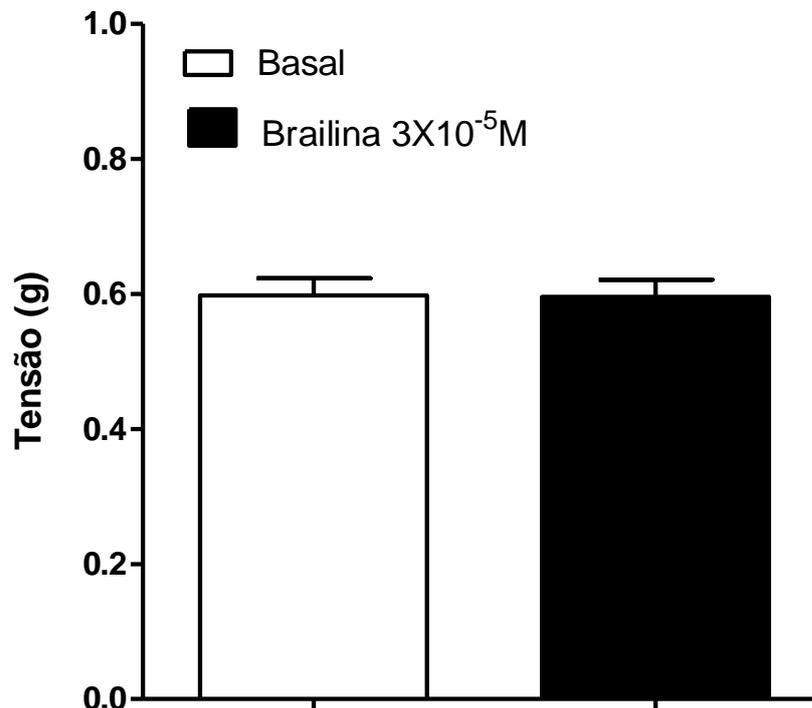


FIGURA 16. A cumarina brailina não altera o tônus muscular basal dos corpos cavernosos isolados de ratos wistar. Gráfico de barras mostrando a brailina ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) adicionada na tensão basal das preparações teciduais em banho de órgãos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. da tensão basal antes (em branco) e depois de 30min incubado com brailina $3 \times 10^{-5} \text{M}$ (em preto). O teste realizado foi teste t de Student pareado, $p < 0,05$ (todos os grupos, $n=5$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos.

5.3. BRAILINA NÃO ALTERA A HABILIDADE CONTRÁTIL DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS WISTAR

Foi avaliado a habilidade contrátil tecidual após o tratamento com brailina. De acordo com o protocolo delineado (4.6.4.), foi investigado a contratilidade tecidual dos corpos cavernosos em tiras sem a incubação com brailina e tiras que incubadas por 30 min. Como pode ser observado na **FIGURA 17**, a brailina na concentração de $3 \times 10^{-5} \text{M}$, parece não afetar o estímulo contrátil promovido por FEN 10^{-5}M .

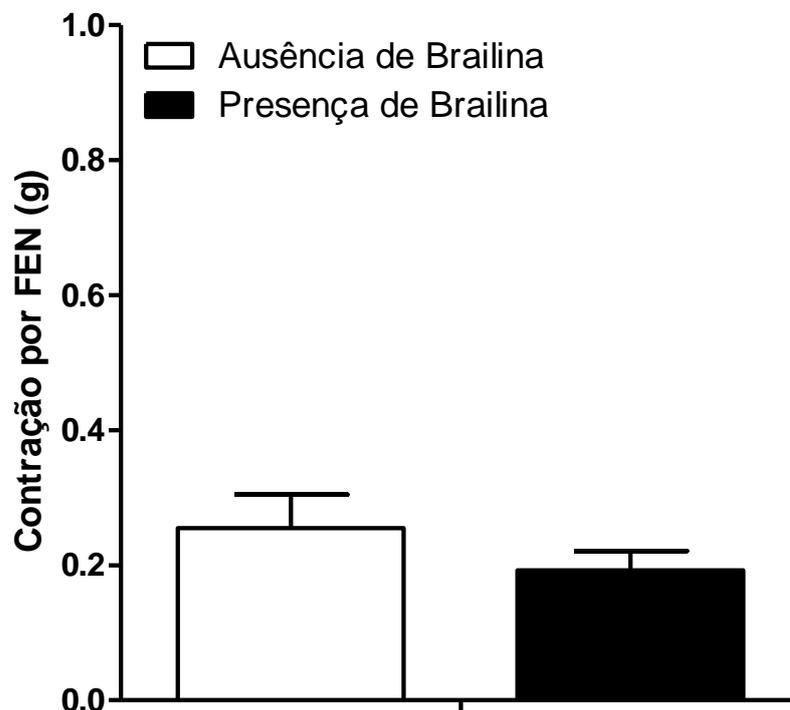


FIGURA 17. Brailina não altera a capacidade contrátil de corpos cavernosos de ratos wistar. Gráfico de barras mostrando a contração de tiras de corpos cavernosos por FEN 10^{-5}M em tiras expostas e não expostas a brailina $3 \times 10^{-5} \text{M}$. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, $p < 0,05$ (todos os grupos, $n=4$). Não foi observada diferença significativa entre as contrações induzidas por agonista FEN na presença ou ausência de brailina $3 \times 10^{-5} \text{M}$.

5.4. BRAILINA PROMOVE RELAXAMENTO EM CORPOS CAVERNOSOS CONTRAÍDOS POR SOLUÇÃO DESPOLARIZANTE KCL 80mM

Foi avaliado se a brailina tem a capacidade de induzir relaxamento em tiras de corpos cavernosos pré-contraídas com solução despolarizante. Como observado na **FIGURA 18**, o efeito relaxante de brailina nas concentrações testadas foi similar tanto em tecidos pré-contraídos por FEN ($E_{3 \times 10^{-4} M} = 115,1 \pm 8,7$; $n=5$) quanto por solução despolarizante com alta concentração de K^+ ($E_{3 \times 10^{-4} M} = 117,2 \pm 5,0$; $n=5$).

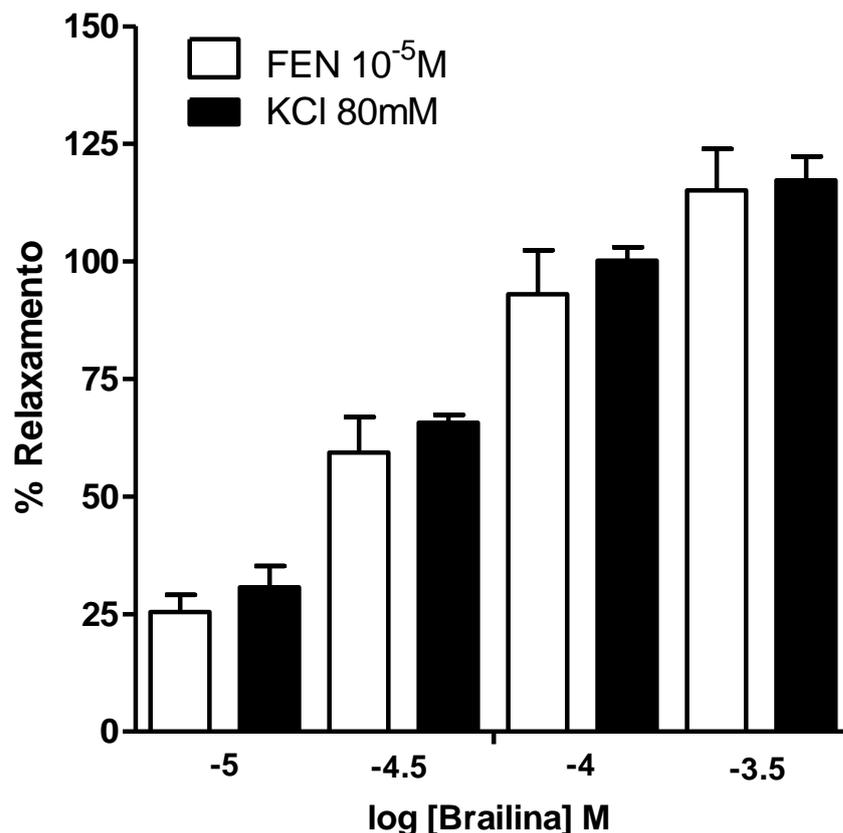


FIGURA 18. Efeito relaxante de brailina em tiras de corpos cavernosos isolados de ratos wistar, pré-contraídas com KCl 80mM. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, $p < 0,05$ (todos os grupos, $n=5$). Não foi observada diferença significativa entre o relaxamento de cada concentração de brailina entre os grupos.

5.5. PARTICIPAÇÃO DA VIA NOS/SGC/PKG NO RELAXAMENTO PROMOVIDO POR BRAILINA

5.5.1. O relaxamento induzido por brailina depende em parte da NOS

No intuito de avaliar se o relaxamento promovido por brailina é influenciado pela atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), foi realizado o protocolo com o inibidor da NOS (L-NAME 10^{-4} M). Na **FIGURA 19** é mostrado que na presença de L-NAME houve diminuição significativa do efeito relaxante de brailina na concentração de 3×10^{-5} M (na ausência de L-NAME: $E_{3 \times 10^{-5}M} = 59,3 \pm 7,5$; $n=5$; na presença de L-NAME: $E_{3 \times 10^{-5}M} = 38,2 \pm 4,0$; $n=5$). Sugerindo que pelo menos em parte, o relaxamento induzido por brailina envolve a participação da enzima NOS.

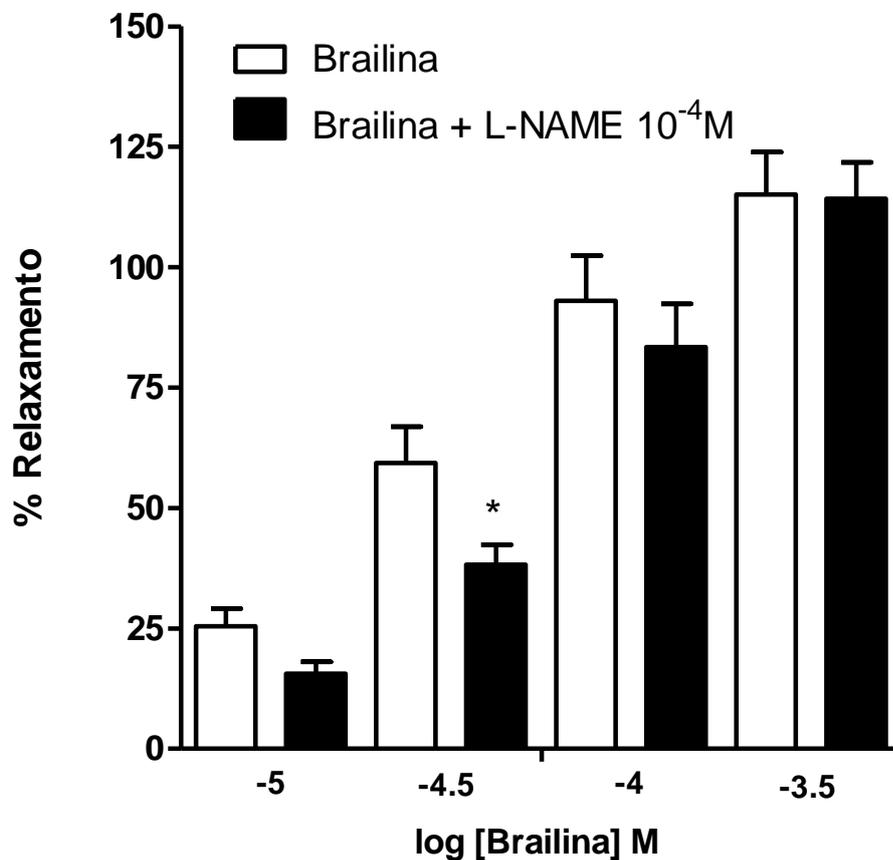


FIGURA 19. Participação da NOS no efeito relaxante de brailina em corpora cavernosa de rato. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por FEN 10^{-5} M, considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, $*p < 0,05$ (todos os grupos, $n=5$). Foi observada diferença significativa entre o relaxamento na concentração de brailina 3×10^{-5} M entre os grupos.

5.5.2. O relaxamento promovido por brailina depende da participação da sGC

Foi avaliado se o relaxamento induzido por brailina é influenciado pela atividade da enzima ciclase de guanilil solúvel (sGC). Como observado na **FIGURA 20**, o relaxamento da brailina foi reduzido em todas as concentrações testadas quando a sGC estava inibida, ex. $E_{3 \times 10^{-4} M} = 115,1 \pm 8,7$; $n=5$; na presença de ODQ $E_{3 \times 10^{-4} M} = 84,9 \pm 7,5$; $n=5$. Então, o resultado sugere que a atividade da sGC é importante para o relaxamento promovido por brailina.

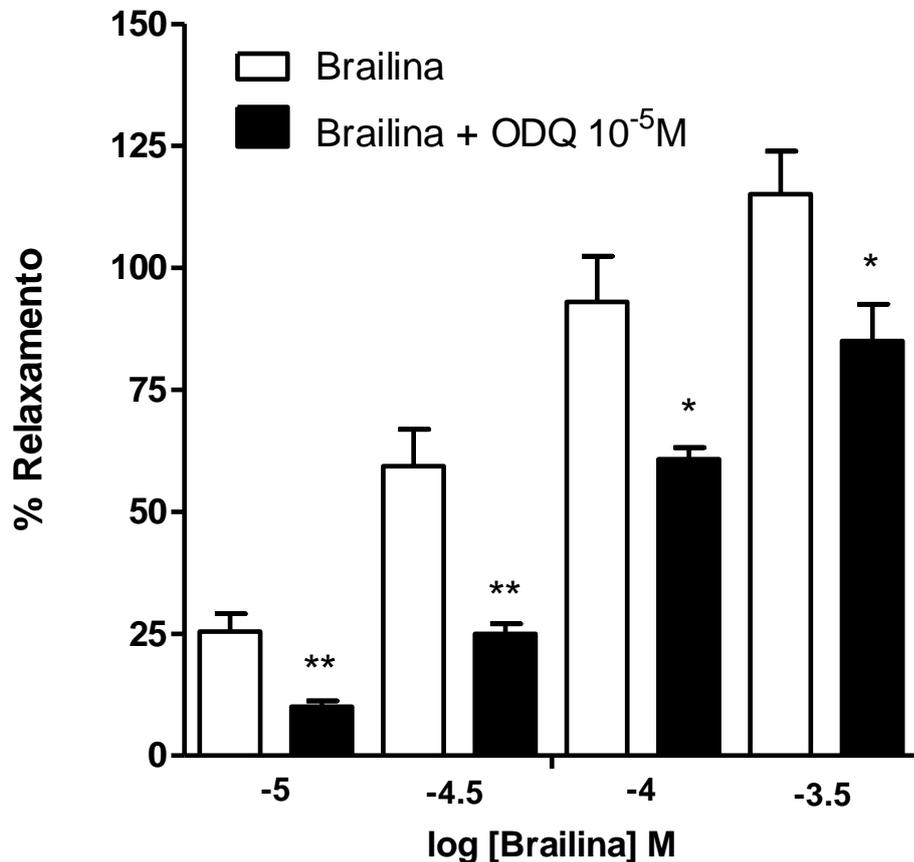


FIGURA 20. Participação da sGC no efeito relaxante da brailina em corpora cavernosa isolada de rato. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por FEN 10^{-5} M, considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (todos os grupos, $n=5$). Foi observada diferença significativa do relaxamento de todas as concentrações testadas de brailina entre os grupos.

5.5.3. O relaxamento promovido por brailina não é afetado pela inibição da PKG

Foi verificado se o relaxamento induzido por brailina é influenciado pela atividade da proteína cinase G (PKG). Como observado na **FIGURA 21** não houve diferença entre os grupos, $E_{3 \times 10^{-4}M} = 115,1 \pm 8,7$; $n=5$; na presença de KT5823: $E_{3 \times 10^{-4}M} = 103,2 \pm 2,0$; $n=5$. Dessa forma, o relaxamento induzido por brailina parece não ser afetado pela inibição da PKG.

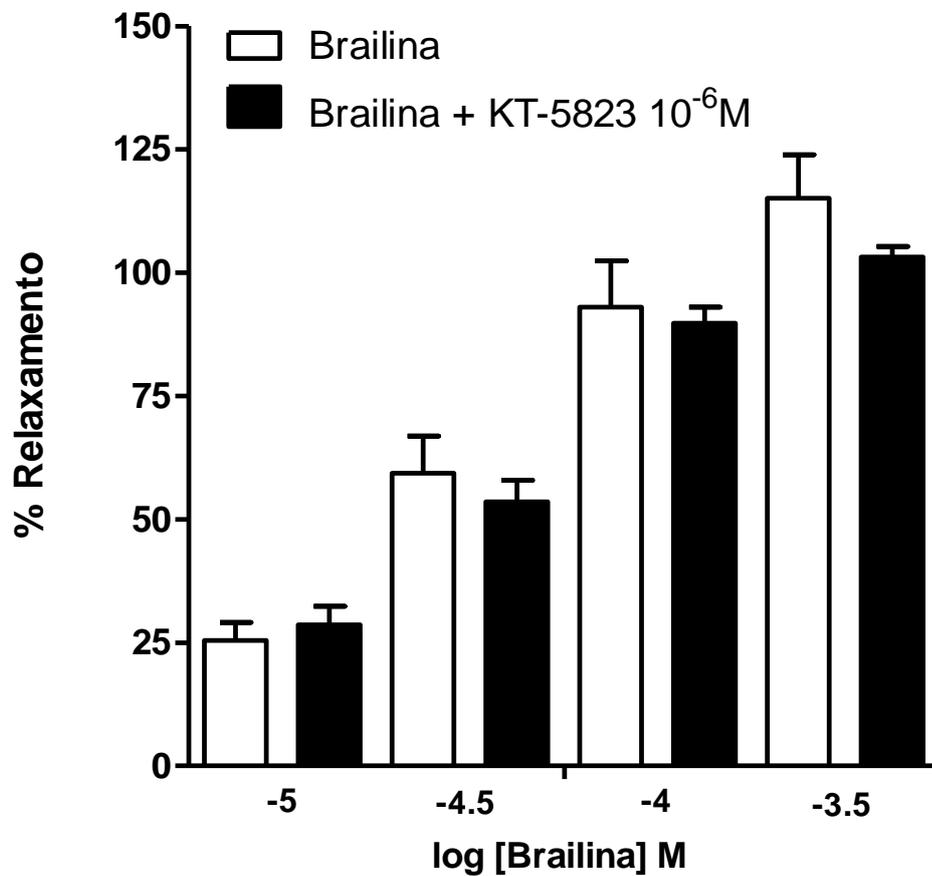


FIGURA 21. PKG não participa do efeito relaxante induzido por brailina em corpora cavernosa. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de brailina (10⁻⁵, 3x10⁻⁵, 10⁻⁴ e 3x10⁻⁴ M) adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média ± e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por FEN 10⁻⁵M, considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, (todos os grupos, n=5). Não houve diferença entre os grupos.

5.6. A VIA AC/PKA NÃO PARTICIPA DO RELAXAMENTO PROMOVIDO POR BRAILINA

5.6.1. O relaxamento promovido por brailina não depende da AC

Foi verificado se o relaxamento induzido por brailina é influenciado pela atividade da enzima adenilato ciclase (AC). Como observado na **FIGURA 22** não houve diferença entre os grupos, exceto na menor concentração, $E_{10^{-5}M} = 25,4 \pm 3,6$; $n=5$; na presença de SQ22536: $E_{10^{-5}M} = 37,6 \pm 2,8$; $n=5$. Dessa forma, o relaxamento induzido por brailina parece ser afetado em parte pela inibição da AC.

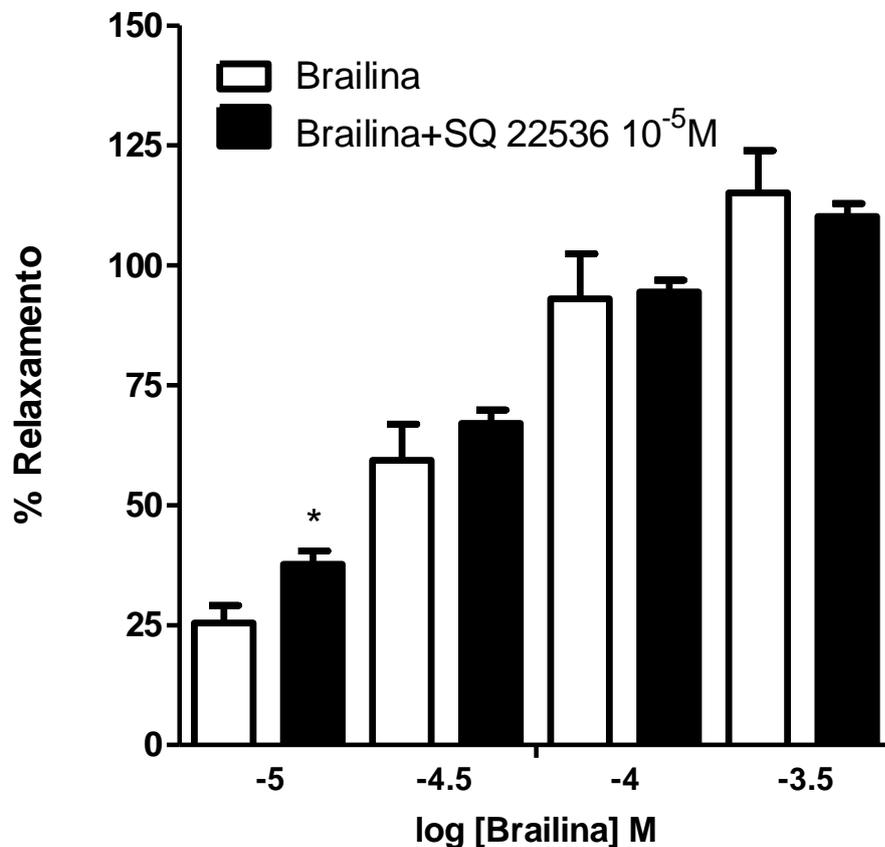


FIGURA 22. AC não participa do efeito relaxante induzido por brailina em corpora cavernosa. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por FEN 10^{-5} M, considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, (todos os grupos, $n=5$). Foi observada diferença significativa entre o relaxamento na concentração de brailina 3×10^{-5} M entre os grupos.

5.6.2. O relaxamento promovido por brailina não é afetado pela inibição da PKA

Foi verificado se o relaxamento induzido por brailina é influenciado pela atividade da proteína cinase A (PKA). Como observado na **FIGURA 23** não houve diferença entre os grupos, $E_{3 \times 10^{-4}M} = 115,1 \pm 8,7$; $n=5$; na presença de KT5720: $E_{3 \times 10^{-4}M} = 114,7 \pm 3,9$; $n=5$. Dessa forma, o relaxamento induzido por brailina parece não ser afetado pela inibição da PKA.

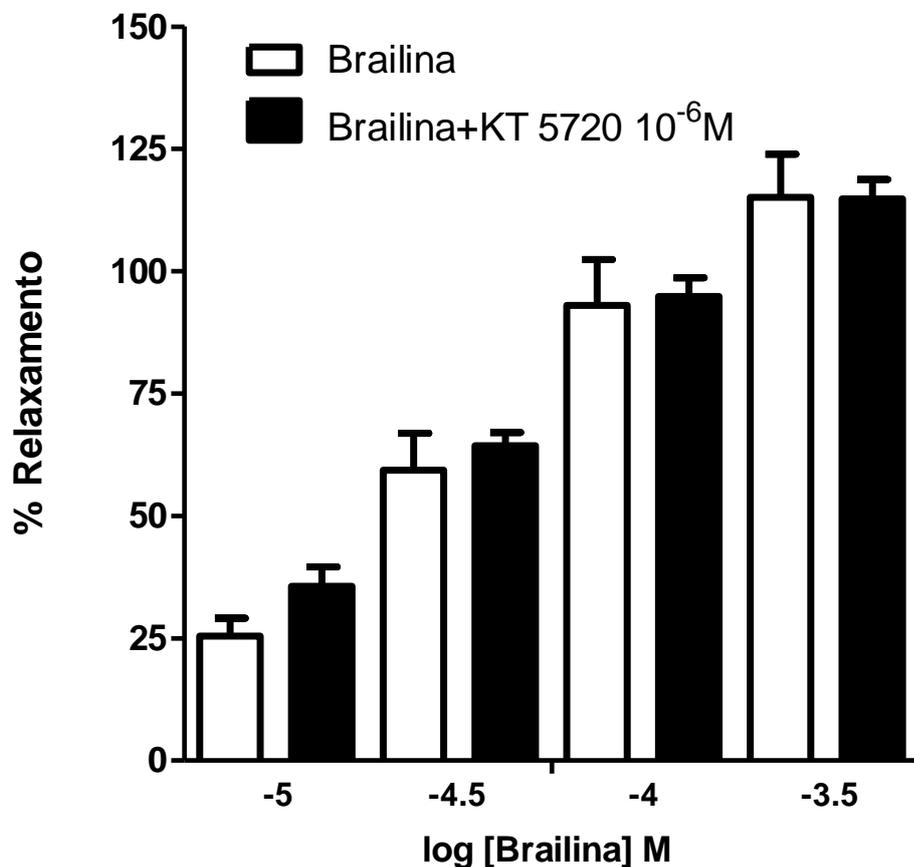


FIGURA 23. PKA não participa do efeito relaxante induzido por brailina em corpora cavernosa. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de brailina (10⁻⁵, 3x10⁻⁵, 10⁻⁴ e 3x10⁻⁴ M) adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média ± e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por FEN 10⁻⁵M, considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, (todos os grupos, n=5). Não houve diferença entre os grupos.

5.7. COMPARAÇÃO DO EFEITO RELAXANTE INDUZIDO POR SILDENAFIL E BRAILINA

Foi comparado se o efeito relaxante induzido por brailina é similar ao promovido por inibidor de fosfodiesterase. De maneira interessante, o perfil de relaxamento induzido por sildenafil foi visualmente similar ao induzido por brailina, uma vez que ambos alcançam a estabilização de tensão para cada concentração em aproximadamente 20min. Ao comparar o efeito dessas substâncias foi verificado que o sildenafil apresentou maior efeito relaxante na concentração de 10^{-5} M (BRA: $E_{10^{-5}M} = 25,4 \pm 3,6$; $n=5$; SIL: $E_{10^{-5}M} = 73,2 \pm 5,7$; $n=5$). Porém, na concentração de 10^{-4} M a brailina apresentou efeito relaxante similar ao sildenafil (BRA: $E_{10^{-4}M} = 92,9 \pm 9,4$; $n=5$; SIL: $E_{10^{-4}M} = 99,6 \pm 3,1$; $n=5$) (FIGURA 24). Foi verificado o efeito relaxante induzido por citrato de sildenafil, um inibidor de fosfodiesterase tipo-5, em tiras de corpos cavernosos (FIGURA 25).

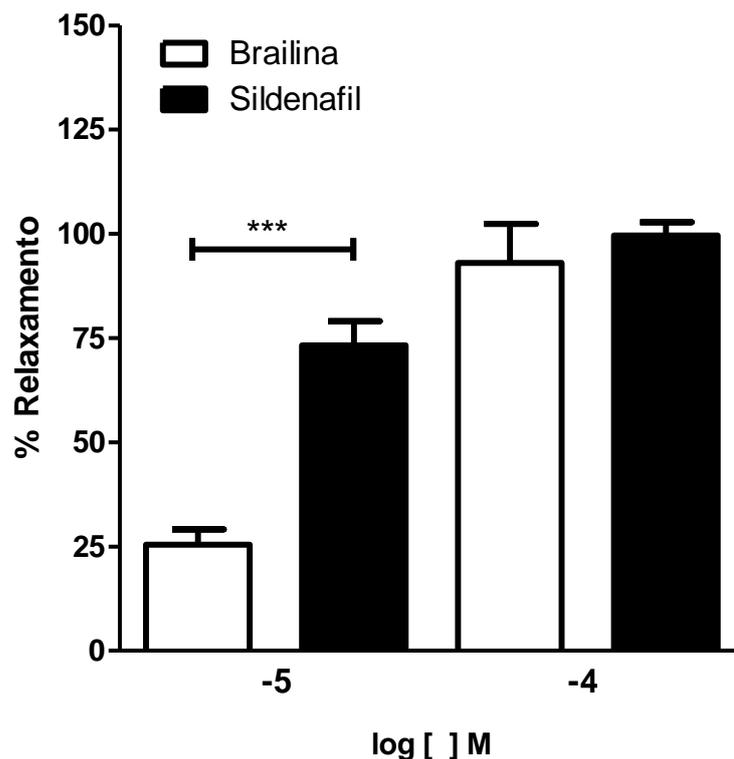


FIGURA 24. Comparação do efeito relaxante de sildenafil e brailina. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante de sildenafil e brailina adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a contração com FEN 10^{-5} M considerada 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, *** $p < 0,001$ (todos os grupos, $n=5$). Foi observada diferença significativa entre os relaxamentos na concentração de 10^{-5} M entre os grupos.

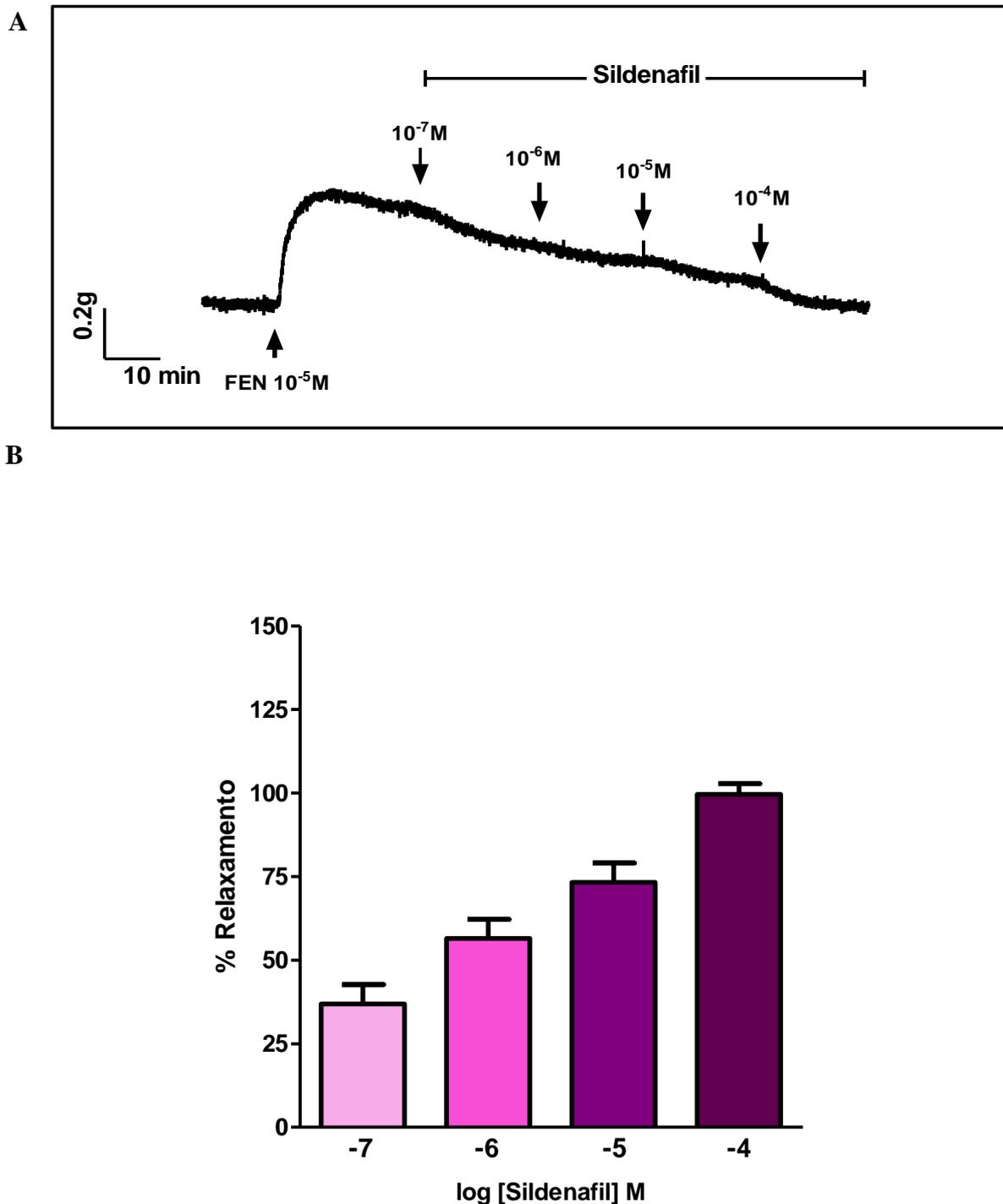


FIGURA 25. Verificação do efeito relaxante de sildenafil em corpo cavernoso de rato wistar. Em A, registro original mostrando o efeito relaxante de sildenafil adicionado cumulativamente (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} e 10^{-4} M) em tira de corpo cavernoso isolado de rato Wistar, pré-contraído por FEN 10^{-5} M. Em B, gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de sildenafil adicionadas às preparações em banho de órgãos ($n=5$). Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a contração com FEN 10^{-5} M considerada 0% de relaxamento.

5.8. BRAILINA NÃO ALTERA A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR NOREPINEFRINA

Foi avaliado se brailina é capaz de modificar a resposta contrátil de um neurotransmissor da via simpática, a norepinefrina (NE) (FIGURA 26). Para isso, foi realizada a adição cumulativa de NE (10^{-10} a 10^{-4} M) em tiras de corpos cavernosos incubadas com brailina, e em tiras não expostas a brailina (3×10^{-5} M). Não foi observado diferença na contração induzida por NE entre as tiras incubadas ou não com brailina. Indicando que brailina parece não interferir na resposta contrátil do tecido frente a estimulação da via simpática.

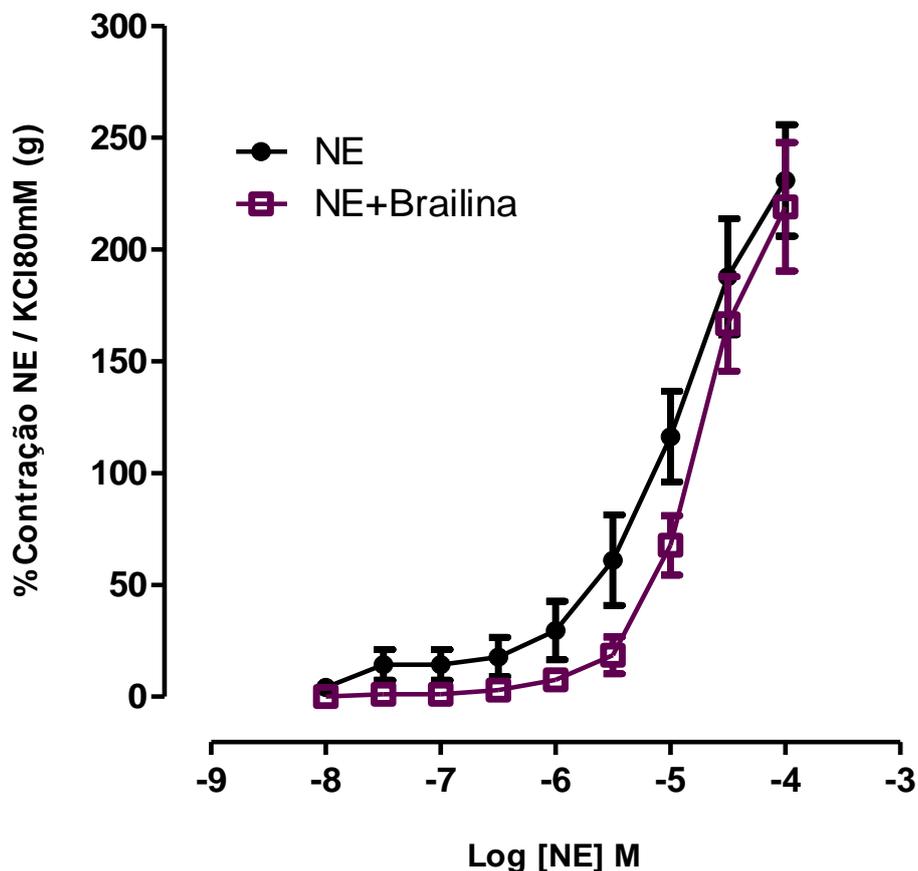


FIGURA 26. Contração induzida por NE não é influenciada por brailina. Curva concentração-resposta mostrando que brailina 3×10^{-5} M não influencia o efeito contraturante de NE (10^{-10} a 10^{-4} M) em preparações de corpos cavernosos em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de contração, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por KCl80 mM. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado para comparar o efeito de cada concentração de NE na presença e ausência de brailina (todos os grupos, $n=5$). Não foi observada diferença significativa entre a contração de nenhuma concentração testada de NE entre os grupos.

5.9. BRAILINA NÃO ALTERA O RELAXAMENTO INDUZIDO POR ACETILCOLINA

Foi avaliado se brailina é capaz de modificar a resposta relaxante de um neurotransmissor da via colinérgica, a acetilcolina (ACh) (FIGURA 27). Para isso, foi realizada a adição cumulativa de ACh (10^{-10} a 10^{-4} M) em tiras de corpos cavernosos pré-contraídos com NE, incubadas ou não com brailina (3×10^{-5} M). Não foi observado diferença no relaxamento induzido por ACh entre as tiras incubadas ou não com brailina. Indicando que brailina parece não interferir na resposta relaxante do tecido frente a estimulação da via colinérgica.

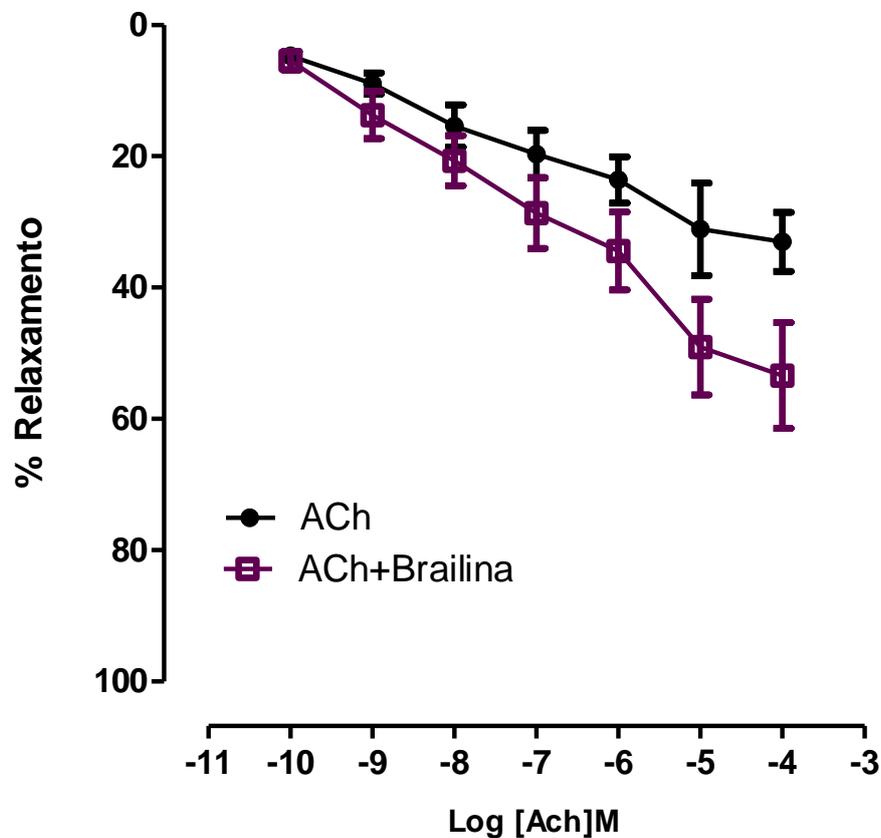


FIGURA 27. Relaxamento induzido por ACh não é influenciado por brailina. Curva concentração-resposta mostrando que brailina 3×10^{-5} M não influencia o efeito relaxante de ACh (10^{-10} a 10^{-4} M) em preparações de corpos cavernosos pré-contraídos com NE em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por FEN 10^{-5} M, considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado para comparar o efeito de cada concentração de ACh na presença e ausência de brailina (todos os grupos, n=5). Não foi observada diferença significativa entre o relaxamento de nenhuma concentração testada de ACh entre os grupos.

5.10. BRILINA POTENCIALIZA O EFEITO RELAXANTE DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO

Foi avaliado se a brailina influencia o relaxamento promovido por agente doador de óxido nítrico. Foram utilizados um composto classicamente utilizado e reconhecido como doador de óxido nítrico, o nitroprussiato de sódio (NPS). Como mostrado na **FIGURA 28**, o relaxamento induzido por NPS foi aumentado na presença de brailina, ex. NPS: $E_{10^{-4}M} = 61,7 \pm 7,6$, $n=5$; na presença de brailina: $E_{10^{-4}M} = 89,8 \pm 9,0$; $n=5$. Sugerindo que a brailina pode potencializar o efeito relaxante de doador de óxido nítrico.

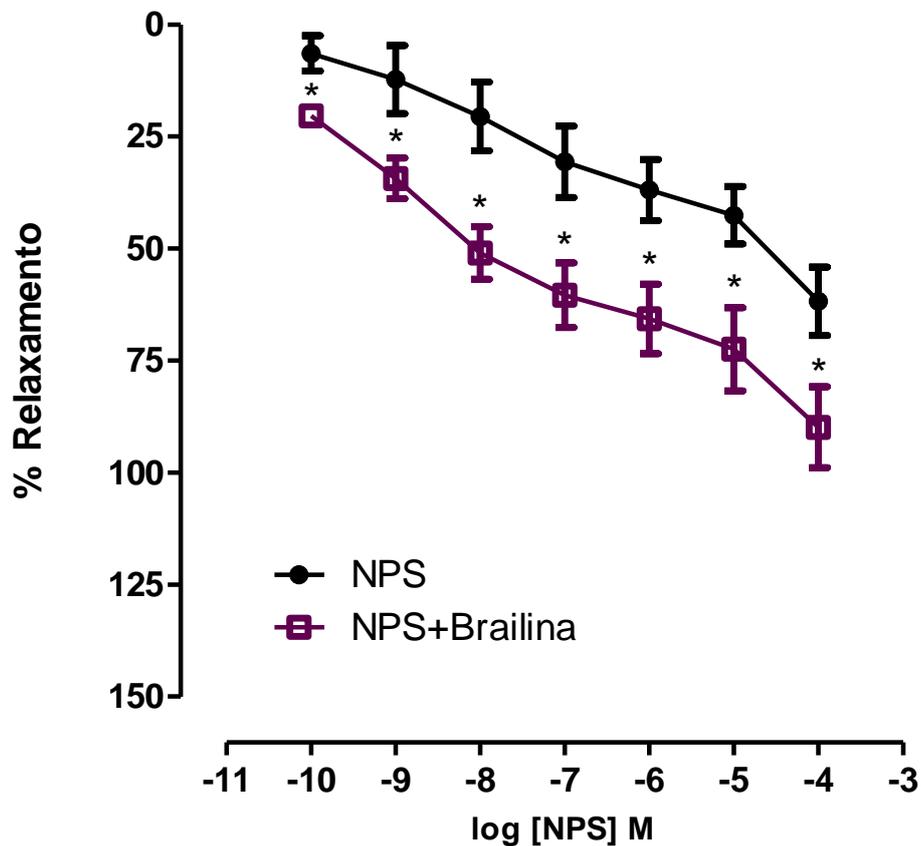


FIGURA 28. Brailina potencializa o relaxamento promovido por doador de óxido nítrico. Gráfico de barras mostrando a influência de brailina $3 \times 10^{-5}M$ no efeito relaxante promovido por NPS (10^{-10} a $10^{-4}M$ em preparações de corpos cavernosos em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração induzida por FEN $10^{-5}M$, considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado para comparar o efeito de cada concentração de NPS na presença e ausência de brailina, $*p < 0,05$, (todos os grupos, $n=5$). Foi observada diferença significativa entre o relaxamento de todas as concentrações testadas de NPS entre os grupos.

5.11. BRAILINA INDUZ EFEITO RELAXANTE EM TIRAS DE CORPOS CAVERNOSOS ISOLADOS DE RATOS SHR

Tendo em vista que a brailina apresenta efeito relaxante em corpo cavernoso de animais Wistar, foi avaliado se a brailina também induz relaxamento em corpo cavernoso isolado de animais SHR. Como observado na **FIGURA 29**, a brailina foi capaz de relaxar o corpo cavernoso de animais SHR de maneira similar ao dos animais Wistar, exceto na menor concentração utilizada (10^{-5} M) (Wistar: $E_{10^{-5}M} = 25,4 \pm 3,6$; $n=5$; SHR: $E_{10^{-5}M} = 16,0 \pm 1,4$; $n=6$).

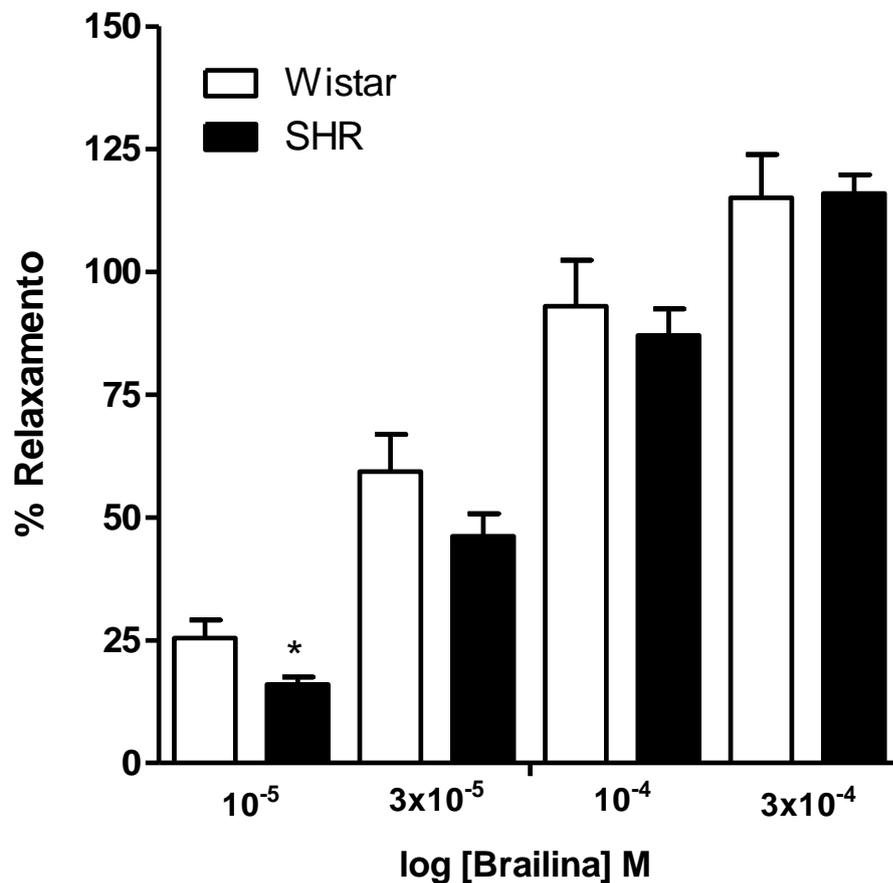


FIGURA 29. Efeito relaxante da cumarina brailina em tiras de corpos cavernosos isolados de ratos SHR. Gráfico de barras mostrando o efeito relaxante das concentrações cumulativas de brailina (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) adicionadas às preparações em banho de órgãos. Os valores representam média \pm e.p.m. do percentual de relaxamento, tendo como referencial a estabilização da contração considerada a 0% de relaxamento. O teste realizado foi teste t de Student não-pareado, $*p < 0,05$ (Wistar $n=5$ e SHR $n=6$). Não foi observada diferença significativa entre o relaxamento de cada concentração de brailina entre os animais espontaneamente hipertensos e o controle, exceto na concentração de 10^{-5} M.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a fornecer evidências experimentais do efeito da brailina em corpo cavernoso isolado de rato Wistar e SHR. De maneira específica, mostrou a participação da via NO/sGC para o seu relaxamento e que a pré-incubação com brailina potencializou o efeito relaxante de doador de óxido nítrico. Dessa forma, os resultados observados nesta pesquisa fornecem indícios pré-clínicos do potencial terapêutico da brailina para o tratamento da disfunção erétil.

A brailina é uma piranocumarina com poucas evidências científicas sobre seu potencial farmacológico. Apesar de ter sido identificada em diversos estudos de avaliação de atividade biológica de extratos (MINGORANCE; ANDRIANTSITOHAINA; ALVAREZ DE SOTOMAYOR, 2008; RAKOTOARISON et al., 2003; RALAY RANAIVO et al., 2004), poucos são os estudos que avaliam essa substância isoladamente. Dentre estes estudos podemos destacar o primeiro, publicado em 1998, que observou efeito inibidor de agregação plaquetária da brailina isolada (TSAI et al., 1998). De maneira interessante, em 2014 foi publicado um estudo que descreveu o potencial efeito inibidor de PDE4 da brailina (LIN et al., 2014). Curiosamente, esses estudos corroboram um com outro, visto que as PDE são enzimas que participam da cascata de sinalização de agregação plaquetária.

A atividade plaquetária pode ser influenciada por diversos fatores sejam eles ativadores de agregação, tais como o ADP, ou inibidores da formação de agregados plaquetários, tais como NO (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1990). É importante ressaltar que os mensageiros secundários cAMP/cGMP são mediadores importantes para o efeito antiagregante. Dessa forma, inibidores de PDE também podem apresentar efeito sobre a cascata de sinalização de agregação plaquetária. O sildenafil, inibidor de PDE-5 utilizado para o tratamento da disfunção erétil, parece não modificar a agregação plaquetária, porém melhora o efeito inibidor induzido por NO (WALLIS et al., 1999). Dessa forma, possivelmente a brailina pode apresentar outro mecanismo de ação que não somente o inibidor de PDE4, essa enzima que é expressa em diversos tecidos, e pode atuar na regulação do tônus de corpos cavernosos (BIVALACQUA et al., 1999). De maneira interessante, as plaquetas não estão envolvidas somente no processo de coagulação sanguínea, mas também como mediadores inflamatórios (YUN et al., 2016).

A inflamação é um fator comum para a formação de placas ateroscleróticas, doenças cardiovasculares, hipertensão e disfunção erétil. O processo crônico inflamatório em vasos sanguíneos, remodelamento da parede vascular, indução de disfunção endotelial com aumento do estresse oxidativo, são descritas por condições clínicas, tais como a hipertensão

(SCHIFFRIN, 2012). Sendo assim, compostos com ação anti-inflamatória podem ser estratégia interessante para tratamento de desordens tais como hipertensão ou disfunção erétil.

Em 2017, foi descrito que a brailina apresenta atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e imunomodulatória (ESPÍRITO-SANTO et al., 2017). Levando esses efeitos em consideração, esse estudo indica que a brailina também pode apresentar atividade farmacológica em desordens que envolvem processos inflamatórios. Dessa forma, o efeito antiagregante plaquetário, inibidor de PDE4 e anti-inflamatório da brailina contribuem para a avaliação dos seus efeitos na vasculatura, bem como poderiam ser um indício de efeito benéfico sobre condições de base inflamatória como a hipertensão.

Tendo em vista esse potencial da brailina em atuar sobre o sistema cardiovascular, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito de brailina em artérias isoladas de ratos wistar, montadas em banho de órgãos. Foi observado que a brailina induz efeito vasodilatador em artérias mesentérica e ilíaca, com preferência diferente das vias de cAMP ou cGMP (dados em processo de submissão). A artéria mesentérica superior é um importante leito vascular que irriga a região mesentérica (ROSENBLUM; BOYLE; SCHWARTZ, 1997), no qual a brailina parece ter preferência pela via cAMP. Enquanto que nas artérias ilíacas, que são responsáveis pela irrigação da parte inferior do corpo e sua ramificação define as artérias pudendais (BILHIM et al., 2011), a brailina parece ter preferência de relaxamento pela via cGMP. Esses resultados sugerem então, que a brailina pode ter outros mecanismos de ação que não somente a inibição de PDE4, uma vez que a PDE4 é específica em linearizar cAMP e assim afetar a via AC/PKA (HOUSLAY; ADAMS, 2003).

Levando em consideração os dados obtidos na literatura citados acima, o presente trabalho teve como hipótese que a brailina é capaz de atuar sobre a musculatura lisa da corpora cavernosa favorecendo sua função erétil, com potencial terapêutico para tratamento da disfunção erétil associada à hipertensão.

Os corpos cavernosos são as principais estruturas responsáveis pelo aumento do tamanho e rigidez do pênis na ereção. Formado por trabéculas de musculatura lisa, envolto por tecido fibroso, é uma estrutura complexa que apresenta várias artérias e veias adjacentes, bem como diferentes inervações (ANDERSSON; WAGNER, 1995). Dado estímulo erétil ocorre vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, relaxamento das trabéculas do corpo cavernoso, maior preenchimento de sangue nos sinusóides promovendo a veno-oclusão e consequente aprisionamento de sangue no pênis (FERNANDES; SOUZA; CARTAFINA, 2018). Tendo em vista a fisiologia da ereção, os processos de vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso são eventos fundamentais para a função erétil. Sabendo-se que a brailina já

apresenta efeito vasodilatador, dessa forma, estudamos o efeito da cumarina brailina em induzir relaxamento da corpora cavernosa a fim de avaliar o potencial terapêutico da brailina para tratar disfunção erétil.

Para alcançar esse objetivo, foram realizados ensaios de contratilidade tecidual por meio da medição de tensão isométrica dos corpos cavernosos montados em banho de órgãos. No qual foi evidenciado o efeito relaxante da cumarina brailina nos corpos cavernosos isolados de ratos.

Com o intuito de avaliar se a brailina relaxa o tecido apenas quando este estiver pré-contraído ou se é capaz de modificar o tônus muscular basal, foi realizado a incubação com a brailina no tecido não contraído. Foi observado que a brailina não altera o tônus basal do tecido, sendo assim, precisa da estimulação contrátil prévia tecidual para promover efeito relaxante. O fato da brailina precisar que o tecido esteja previamente contraído pode ser interessante para a promoção da ereção, afinal no estado flácido o pênis é regulado pela via simpática (GIULIANO et al., 1993), e casos de disfunção erétil associado a hipertensão apresentam tônus simpático aumentado (SILVA et al., 2016), o que favoreceria as ações de brailina.

Porém, houve a preocupação se a brailina estaria promovendo efeito danoso ao tecido ao invés de efeito relaxante. Já foi descrito que a brailina apresenta efeito inibidor da viabilidade celular *in vitro* de macrófagos ativados na concentração de $80\mu\text{M}$ ($8 \times 10^{-5}\text{M}$) (ESPÍRITO-SANTO et al., 2017). Adicionalmente, outro estudo realizou ensaio de citotoxicidade em células cancerosas e verificou que a brailina não apresentou efeito tóxico, com $\text{IC}_{50} > 300\mu\text{M}$ ($3 \times 10^{-4}\text{M}$) (SHOKOOHINIA et al., 2014). Levando esses dados em conjunto, é interessante realizar um ensaio de citotoxicidade em células musculares lisas isoladas de corpo cavernoso e artérias a fim de verificar se a brailina pode causar algum efeito nocivo a célula isolada. Esta foi uma limitação do nosso trabalho que não foi possível isolar células musculares lisas de corpo cavernoso e realizar tal avaliação. Estudos adicionais deverão ser realizados com este propósito. Porém, em ensaios com corpo cavernoso isolado, foi observado a habilidade contrátil tecidual à agonista $\alpha 1$ -adrenérgico (fenilefrina-FEN) não foi modificada após exposição do tecido a brailina, uma vez que não houve diferença entre a segunda contração promovida por FEN 10^{-5}M no grupo controle e no incubado com a brailina a $3 \times 10^{-5}\text{M}$. Sugerindo que brailina não afeta a viabilidade contrátil do tecido erétil isolado de ratos Wistar. A partir desses resultados fomos avaliar o mecanismo de ação do efeito relaxante da brailina.

O relaxamento da célula muscular lisa pode ser provocado pela abertura de canais para potássio (K^+), a exemplo do canal para K^+ sensível ao cálcio de alta condutância (BK_{Ca}). O K^+ normalmente está em maior concentração no meio intracelular, então a abertura desses canais promove a saída desse íon para o meio extracelular de acordo com o gradiente de concentração

(ARCHER, 2002). Logo, quando há alta concentração de K^+ no meio extracelular, esse gradiente de concentração é modificado, impedindo a saída de K^+ da célula. Sendo assim, mecanismos de relaxamento que utilizam a saída de K^+ para o meio extracelular, tem sua ação diminuída quando na presença de soluções com alta concentração de K^+ . A exemplo do mirabegron, agonista de receptor β_3 -adrenérgico, que tem seu efeito relaxante diminuído quando o corpo cavernoso estava pré-contraído com solução de KCl 80mM (DE OLIVEIRA et al., 2019).

No presente estudo foi observado que o relaxamento promovido por brailina não é afetado quando o tecido é contraído por uma solução com alta concentração de K^+ (Tyrode com KCl 80mM) capaz de despolarizar a membrana e manter uma contração tônica. De maneira similar, já foi descrito que o doador de óxido nítrico, o NPS, também não tem o efeito relaxante alterado quando o tecido é pré-contraído com KCl 80mM em corpo cavernoso de coelhos (CHIOU; CHEN; CHEN, 1998). A solução despolarizante contendo KCl 80mM altera a concentração de K^+ extracelular, modificando a diferença de potencial de membrana das células, favorecendo sua despolarização e chegada ao potencial de ação com consequente abertura de canais para cálcio, levando a contração da célula muscular lisa (TRAISH et al., 1998). Ressaltando que, além de favorecer a contração, vias de relaxamento que dependem da saída de K^+ da célula é prejudicado. Sendo assim, esses dados indicam que provavelmente a saída de K^+ não é importante para o relaxamento promovido por brailina nas concentrações testadas.

A via NO/cGMP é uma via de sinalização importante de relaxamento da musculatura lisa (CHUANG et al., 1998), envolve a participação de diversas enzimas, tais como a óxido nítrico sintase (NOS), ciclase de guanilil solúvel (sGC), proteína cinase dependente de cGMP (PKG) e fosfodiesterases (PDE). Adicionalmente, há a participação de diferentes tipos celulares envolvidos nessa via de relaxamento, tais como células nervosas, endoteliais e musculares. Assim, disfunções em algum tipo celular podem prejudicar o relaxamento da via NO/cGMP, lembrando que o quadro de hipertensão, diabetes e disfunção erétil tem como fator comum a disfunção endotelial (BIVALACQUA et al., 2003). Dessa forma, na disfunção erétil a via NO/cGMP está prejudicada, assim, estratégias terapêuticas que possam reverter esse quadro são interessantes.

Logo, foi verificado se o relaxamento promovido por brailina é dependente dessa via NO/cGMP. A inibição da NOS afeta o relaxamento promovido por brailina, apenas na concentração de $3 \times 10^{-5}M$ que houve diminuição do relaxamento quando a NOS estava inibida. Sugerindo que a NOS parece participar de forma discreta no relaxamento induzido por brailina.

Diante disso, foi escolhida a concentração de $3 \times 10^{-5} \text{M}$ para avaliar alguns passos do mecanismo de ação da brailina em tecido erétil de ratos.

Adicionalmente, verificou-se o passo seguinte após cascata de síntese do NO, a sGC. A inibição da sGC com ODQ diminuiu de maneira significativa o relaxamento promovido em todas as concentrações testadas de brailina, entretanto o efeito não foi abolido. Esse dado é muito interessante por mostrar que a ativação da sGC é importante para que a brailina possa relaxar o corpo cavernoso isolado. Porém, não sabemos ao certo se a brailina poderia atuar como ativadora de sGC, ou mesmo inibidora de outro subtipo de PDE que não a PDE4 (específica para cAMP). De maneira interessante, o composto YC-1 que é um ativador de sGC, causa relaxamento de corpo cavernoso e também já foi descrito por inibir agregação plaquetária. O YC-1 apresenta efeito sinérgico ao NPS na ativação da sGC, porém na presença de ODQ o relaxamento induzido por YC-1 não é afetado, diferente do que ocorre com o NPS que tem seu efeito reduzido na presença de ODQ. Isso por que o NPS, assim como o ODQ atua no grupo heme da sGC; indicando que o YC-1 interage com sGC em local diferente do grupo heme (NAKANE et al., 2002).

Seguindo a cascata de sinalização, o cGMP gerado pela ativação da sGC é capaz de ativar a PKG. Ao inibir a PKG foi observado que não houve diferença no relaxamento da BRA quando na presença do inibidor KT5823 a 10^{-6}M . Tendo isso em vista, é necessário avaliar a atividade da PKG na presença de outro inibidor. Além disso, talvez seja um indício de que outros alvos moleculares podem ser modulados pela brailina e favorecer o relaxamento do tecido. A exemplo de modulações em alvos intracelulares da célula muscular lisa, como a modificação na liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, diminuição da entrada de íons Ca^{2+} do meio extracelular, alteração da interação entre Ca^{2+} -calmodulina, diminuição da ativação da via RhoA-Rho cinase, ou mesmo a modificação reversível do acoplamento actina-miosina.

É descrito que a ativação da via AC/PKA interfere nos níveis de cGMP, uma vez que cAMP inibe PDE-5 e ativa PKG, sendo esse efeito observado tanto pela ativação do receptor via prostaglandina E ou pela ativação direta da adenilato ciclase (AC) via forskolina (KIM et al., 2000). Tendo em vista a regulação cruzada entre cGMP e cAMP, e que a via AC/PKA também é importante para o relaxamento da musculatura lisa dependente de nucleotídeo cíclico, analisamos a influência de brailina nessa sinalização. A AC pode ser ativada quando um ligante interage com receptor na membrana plasmática acoplado a proteína Gs, a qual aumenta a concentração de cAMP, que então pode modular a enzima dependente de cAMP (PKA) que fosforila componentes celulares levando ao relaxamento da célula muscular lisa (RUIZ RUBIO

et al., 2004). Tendo em vista que a brailina já foi descrita como potente inibidora de PDE4, e que a PDE4 é específica para degradar cAMP, o presente estudo avaliou a participação dessa via de sinalização no relaxamento induzido por brailina.

Verificou-se que a brailina não teve seu relaxamento diminuído quando as enzimas AC ou PKA estavam inibidas. Indicando que provavelmente essa via de sinalização não é importante para o relaxamento induzido por brailina em corpo cavernoso. Curiosamente, a via NO/cGMP foi preferencial no vasorrelaxamento de artérias ilíacas induzido por brailina (dados não publicados), vaso sanguíneo que irrigam a parte inferior do corpo, inclusive as ramificações da artéria ilíaca formam as artérias pudendais, que segundo Manabe e colaboradores, essas artérias pudendais são responsáveis por 70% da irrigação sanguínea ao pênis (MANABE et al., 2000). Enquanto a via AC/PKA foi mais importante no vasorrelaxamento de artérias mesentéricas (dados não publicados). De tal forma que este resultado corrobora os anteriores em que a brailina parece ter sinalização diferenciada a depender do tecido estudado e pode ser mais voltado a via NO/cGMP na modulação da ereção peniana.

O tratamento farmacológico de primeira linha para disfunção erétil são os inibidores de PDE (SIMOPOULOS; TRINIDAD, 2013), então como forma de avaliar o potencial terapêutico da brailina, comparamos seu efeito com o citrato de sildenafil. Apesar de em menor concentração o sildenafil apresentou efeito relaxante maior do que a brailina, na concentração de 10^{-4} M as duas substâncias tiveram eficácia similar. De maneira interessante, ambas as substâncias apresentaram o mesmo perfil de relaxamento, levando o mesmo tempo para alcançar o platô. Assim, a estrutura molecular da brailina apresenta potencial para o desenvolvimento de fármacos, a fim de melhorar seu efeito relaxante via estratégias *in silico*.

As PDE compreendem 11 famílias de enzimas importantes para a regulação das vias de sinalização dependentes de nucleotídeos cíclicos, uma vez que podem interagir com cAMP ou cGMP tornando essas moléculas não funcionais para a via de relaxamento. Apresentam ampla distribuição, e também diferem quanto a cinética e especificidade ao nucleotídeo (BISCHOFF, 2004). No corpo cavernoso as PDE predominantes são a PDE2, PDE3 e PDE5 (MORELAND; GOLDSTEIN; TRAISH, 1998). Por isso também, o sucesso terapêutico do uso de inibidores de PDE-5 para o tratamento da disfunção erétil. Cada isoenzima apresenta afinidade diferente para cAMP ou cGMP, sendo a PDE2 não específica, a PDE3 para cAMP e a PDE5 para cGMP (BISCHOFF, 2004). Dessa forma, talvez a brailina possa interagir com outras PDE além da PDE4, que é mais encontrada nas vias respiratórias.

O estado flácido é regulado pela via simpática, via neurotransmissor norepinefrina (NE)(GIULIANO et al., 1993). Essa via de sinalização está regulada positivamente na

hipertensão (FISHER; PATON, 2012), fato que desfavorece a indução de relaxamento dos vasos e trabéculas do corpo cavernoso no momento da ereção. Logo, foi avaliado se a brailina é capaz de interferir na contração induzida por NE em corpo cavernoso. E foi observado que a brailina não altera a resposta contrátil do tecido a NE de maneira significativa, sugerindo que a brailina não interfere na capacidade contrátil induzida pela ativação simpática no corpo cavernoso.

Dado o estímulo erétil, há a participação da via colinérgica, principalmente pela atuação da acetilcolina (ACh). A ACh liberada inibe a sinalização da NE, diminuindo o estímulo simpático, inibindo o estado flácido do pênis (KLINGE; SJÖSTRAND, 1977). Adicionalmente, a ACh interage com receptores muscarínicos na célula endotelial, que por meio de uma cascata de sinalização leva a ativação da NOS (KIM et al., 1991). A NOS ativa então, tendo seus cofatores e substratos, produz NO das células endoteliais, que então pode atuar na célula muscular lisa ativando a sGC. Em condições de disfunção endotelial o relaxamento via inervação colinérgica fica prejudicado, o que pode contribuir para o quadro de disfunção erétil. Dessa forma, foi avaliado se a brailina influencia essa via de sinalização, favorecendo o relaxamento induzido por ACh. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre o relaxamento promovido por ACh na presença ou ausência de brailina. Assim, a brailina, pelo menos de forma aguda, parece não modificar essa via de sinalização na concentração testada. Curiosamente, foi descrito que o sildenafil não alterou o relaxamento induzido por ACh em corpo cavernoso de humano, porém melhorou o efeito relaxante de nitroglicerina, um doador de NO (JANSKUL et al., 2012).

No momento da ereção, além das fibras colinérgicas liberarem ACh, as fibras não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC) liberam NO, então o NO liberado se difunde relaxando a musculatura lisa das artérias e do corpo cavernoso (KIM et al., 1991). As fibras NANC apresentam em seu conteúdo celular a enzima NOS neuronal, assim, a liberação de NO é promovida pela atividade desta enzima. É importante ressaltar que a resposta do tecido a esse agente dilatador é crucial para que haja a ereção. Levando isso em consideração, foi verificado se a brailina influencia o relaxamento promovido por um clássico doador de óxido nítrico, o NPS (BUSH et al., 1992). Foi observado que o tecido incubado com brailina ($3 \times 10^{-5} \text{M}$) teve melhor resposta relaxante ao NPS do que os corpos cavernosos relaxados por NPS sem brailina. Esse dado é relevante ao considerarmos que a promoção da ereção no indivíduo via NO pode ser melhorada quando na presença de brailina.

Curiosamente, o relaxamento melhorado do NPS na presença de brailina corrobora com os resultados anteriores. Isso porque, assim como NO, o NPS interage com o grupo heme da sGC, causando mudança conformacional que leva a sua ativação, favorecendo a conversão de

GTP em cGMP (NAKANE et al., 2002). Assim, parece que a brailina induz relaxamento via NO/sGMP, dependendo da ativação de sGC, que pode ser realizada por agente doador de NO.

Tendo em vista todos os resultados obtidos, de que a brailina apresenta efeito relaxante da corpora cavernosa e que dessa forma apresenta potencial para o tratamento da disfunção erétil, houve o questionamento se a brailina teria o efeito relaxante também em modelo experimental de disfunção erétil. Neste trabalho foram utilizados os animais espontaneamente hipertensos (SHR), que é um modelo clássico de estudos experimentais sobre hipertensão (CHIUEH; KOPIN, 1978), mas que também é descrito por apresentar disfunção erétil de maneira similar ao que ocorre nos humanos. Isso porque, os animais SHR apresentam menor pressão intracavernosa antes mesmo das alterações vasculares características da hipertensão (BEHR-ROUSSEL et al., 2004); fato similar ao que ocorre no humano, no qual a disfunção erétil pode anteceder em até três anos um evento cardiovascular (THOMPSON et al., 2005).

Assim, foi realizada a comparação do efeito da brailina entre ratos SHR e os ratos controle (Wistar). Foi observado que não há diferença no relaxamento promovido por brailina nos corpos cavernosos de animais sadios e com disfunção erétil, exceto na menor concentração utilizada, de 10^{-5} M. Esse resultado é muito importante visto que é descrito na literatura que os SHR apresentam disfunção endotelial, remodelamento da estrutura vascular e menor resposta a estímulos relaxantes quando comparado aos ratos controle (SCHIFFRIN, 2012). Pode ser sugerido que possivelmente, a brailina pode ter um alvo molecular que não está afetado no quadro de disfunção erétil, ou mesmo apresentar outro mecanismo de ação nesses animais. De maneira geral, esse resultado evidencia o potencial da brailina, e relacionando ao indivíduo com disfunção erétil, pode ser um composto importante para induzir ereção no indivíduo com alterações estruturais e funcionais diretamente relacionadas ao quadro de disfunção erétil.

Outros alvos moleculares devem ser estudados para esclarecer o mecanismo de ação do efeito relaxante da brailina em corpo cavernoso de rato. Não se sabe ao certo se a brailina poderia interferir diretamente sobre as proteínas contráteis do músculo liso, inibindo o ciclo de excitação-acoplamento e conseqüentemente levar a relaxamento do tecido. Além do mais, a brailina poderia além de ativar mecanismos relaxantes, poderia atuar inibindo alguma via de contração, como a via RhoA-Rho cinase, acoplamento Ca^{2+} -calmodulina, bloqueio de canais de Ca^{2+} para diminuição da liberação de Ca^{2+} no citosol. Adicionalmente, é necessário observar a participação de PDE, utilizando inibidores tais como o citrato de sildenafil (iPDE-5) ou rolipram (iPDE-4), previamente a curva de relaxamento da brailina. Além disso, seria importante para elucidar o mecanismo de ação da brailina, dosar a concentração de nucleotídeos

cíclicos após o período de incubação. Dessa forma, seria verificado se a brailina aumenta os níveis de cAMP e/ou cGMP no meio citosólico.

Além disso, ensaios *in vivo* devem ser realizados para avaliar se a brailina influencia a função erétil dos ratos. Dessa forma ensaios como avaliação da pressão intracavernosa na presença de brailina pode ser estratégia interessante, bem como a avaliação do ensaio de ereção fármaco-induzida do animal SHR e Wistar na presença brailina. Entretanto, podemos concluir que os resultados apresentados neste trabalho servem de indício pré-clínico do potencial terapêutico da brailina para o tratamento da disfunção erétil associada a hipertensão.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, o presente estudo mostrou pela primeira vez que a cumarina brailina apresenta efeito relaxante em corpora cavernosa isolada de ratos. De maneira específica, a via de sinalização NO/sGC parece ser importante, enquanto a via AC/PKA parece não modular o efeito relaxante induzido por brailina. Adicionalmente, a brailina pode favorecer o relaxamento induzido por doador de óxido nítrico, bem como induzir relaxamento da corpora cavernosa de ratos SHR, de maneira similar aos ratos normotensos, sugerindo potencial terapêutico para disfunção erétil associada a hipertensão. Outros estudos devem ser realizados a fim de compreender outros aspectos da influência de brailina sobre a função erétil para melhor elucidar o mecanismo de ação.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

8.1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA BRILINA SOBRE A EXPRESSÃO DE DIFERENTES PROTEÍNAS IMPORTANTES PARA A FUNÇÃO ERÉTIL

Com o objetivo de avaliar a influência de brailina sobre a expressão de proteínas importantes para a função erétil será realizado um ensaio de Western-blotting. *O processo de obtenção das amostras já foi realizada, faltando apenas a realização da técnica de Western-blotting.*

Inicialmente, após a eutanásia dos animais Wistar, houve a coleta dos corpos cavernosos e artérias pudendais. Em fluxo laminar, as amostras de tecido foram mantidas em placa de 24 poços contendo meio nutritivo RPMI, em seguida foram incubados com diferentes tratamentos, veículo, sildenafil, bralina sob diferentes concentrações (10^{-5} e 10^{-4} M). Após o período de incubação de 24h em incubadoras de CO₂, as amostras e os meios de cultivo foram armazenados a -80°C. Posteriormente, foi realizado o protocolo de extração de proteínas, para isso os tecidos foram mantidos em solução gelada contendo inibidores de proteases e fosfatases e estocados a -30°C. Os tecidos foram homogeneizados no aparelho Moinho vibratório MM200 (Retsch, Haan, Alemanha) utilizando beads magnéticas, operado em velocidade máxima. Os extratos foram centrifugados a 3000rpm, 4°C, por 20min a fim de coletar a fase aquosa que contem as proteínas e então foram estocadas a -30°C. As concentrações de proteínas foram determinadas utilizando um aparelho de nanodrop (Maestrogen, Las Vegas, EUA). E estão armazenadas a -30°C para dar continuidade ao protocolo e realizar a técnica de avaliação de expressão de proteínas.

As amostras contendo quantidades iguais de proteína (50µg) serão tratadas com tampão Laemmli (15µl) contendo ditioneitol (DTT) adicionalmente à solução reagente de extração de proteínas teciduais (T-PER) de volume complementar ao volume de proteínas, obtendo-se o volume final de 30µl em todas as amostras. As amostras preparadas serão aquecidas a 100°C por 5min e adicionadas ao gel de separação (SDS8%) inicialmente a 75V por 30min e seguida a 100V por 1,5h juntamente com o padrão de peso molecular, afim de separar as proteínas pela técnica de eletroforese em aparelho específico (Bio-rad, Hercules, EUA). As proteínas serão transferidas por diferença elétrica para a membrana de PVDF a 15V, por 18h sob refrigeração. Após a transferência, os locais inespecíficos da membrana serão bloqueados com solução de bloqueio (leite desnatado ou BSA a 5% em 20ml de solução TBS-T) refrigerado, por 3h. A seguir, a membrana será incubada com anticorpos primários para enzimas envolvidas na

resposta contrátil, a exemplo da NOS, sGC, AC, PDE4, PDE5, p-MLCK, ROCK e o padrão β -actina, por 16h sob agitação e refrigeração. A solução contendo anticorpo primário será retirada após três lavagens com solução TBS-T sob agitação a temperatura ambiente por 10min, em seguida a membrana será incubada com solução contendo anticorpo secundário por 2h. A medida da expressão proteica, dada pela intensidade das bandas na membrana, será determinada por análise de quimioluminescência fornecida por um espectrofotômetro (Modelo ImageQuant LAS 500, GE, Massachusetts, EUA).

8.2. ANÁLISE *IN SILICO*

Com o objetivo de avaliar a possível afinidade da brailina por alvos biológicos e sua similaridade com outros fármacos utilizados será realizada uma abordagem *in silico*. Por meio de simulação computacional será avaliada se a molécula de brailina apresenta afinidade pelos sítios ativos dos subtipos de fosfodiesterase encontrados no corpo cavernoso, bem como a possibilidade da mesma ser um ativador de ciclase de guanilil solúvel. Ao avaliar a interação de agonistas ou inibidores conhecidos das respectivas proteínas, poderá ser avaliado se a brailina também apresenta afinidade nesses sítios, e se apresenta similaridades com esses compostos. A docagem molecular que será utilizada deixará fixadas as proteínas e a cada possível pose de interação com a brailina será dado uma pontuação baseada em um modelo matemático que prevê a força de interações moleculares. Adicionalmente, será realizado o ensaio de avaliação de similaridade da brailina com fármacos que modulam a atividade das fosfodiesterasas e ciclase de guanilil solúvel. Os dados conformacionais das proteínas podem ser obtidos pela plataforma Protein Data Bank Para isso, a estrutura tridimensional da brailina deverá ser desenhada utilizando o software ChemDraw Ultra 12.0. Obtendo-se a estrutura das enzimas e da brailina, a docagem molecular poderá ser realizada utilizando o software DockThor.

8.3. ENSAIO DA APOMORFINA

Será realizado o teste de ereção fármaco-induzida nos animais, afim de investigar se a brailina é capaz de melhorar a função erétil dos ratos. Nesse ensaio será utilizado a apomorfina como fármaco indutor de ereção e haverá comparação do efeito pró-erétil da apomorfina com e sem brailina e também se a brailina administrada sozinha pode influenciar a função erétil dos animais. Para isso ratos Wistar, com 12 semanas, serão divididos em 5 grupos: salina, veículo, brailina, apomorfina e brailina+apomorfina. Os animais receberão tratamento agudo com uma dose intravenosa de salina, veículo ou brailina.

Inicialmente os ratos serão colocados em uma caixa de acrílico (60 x 40 x 30 cm) contendo uma câmara isolada posicionada no fundo, por período de adaptação de 10 minutos. Após esse tempo cada rato receberá seus respectivos tratamentos, no caso do grupo apomorfina os mesmos receberão uma injeção subcutânea (1 ml/kg) na dose de 80 µg/kg, no grupo brailina a dose de 1mg/kg. O comportamento dos animais relacionados a resposta erétil será observado e contado durante 30 minutos em um sistema de gravação de vídeo. A função erétil será definida como exibição de arqueamento côncavo das costas seguido por movimentos pélvicos, exposição por completo da glândula do pênis inchado e eixo distal, e da preparação imediata da área genital após a ejaculação (HALE et al., 2002). Nem todos os comportamentos serão necessários para ser considerado um evento erétil. Apenas um pênis emergente ingurgitado será necessário. O tempo de atividade de início e duração será medido para cada grupo.

REFERÊNCIAS

ABDO, C. H. N. *et al.* Disfunção erétil: resultados do estudo da vida sexual do brasileiro. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 6, p. 424–429, 2006.

ALTHOF, S. E. *et al.* Why do so many people drop out from auto-injection therapy for impotence? **Journal of Sex and Marital Therapy**, v. 15, n. 2, p. 121–129, 1989.

ANDERSSON, K.-E. Erectile Physiological and Pathophysiological Pathways Involved in Erectile Dysfunction. **Journal of Urology**, v. 170, n. 2S, 2003.

ANDERSSON, K. **Neurophysiology** = pharmacology of erection. 2001. p. 8–17.

ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 191–236, 1 jan. 1995.

ANDRÉ, E. *et al.* Role of nitric oxide and K⁺ channels in relaxation induced by polygodial in rabbit corpus cavernosum in vitro. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 300–306, 2003.

ANET, F. A. L.; HUGHES, G. K.; RITCHIE, E. The Chemical Constituents of Australian Flindersia Species. II. Braylin and Brayleyanin. **Australian Journal of Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 608–615, 1949.

ARCHER, S. L. Potassium channels and erectile dysfunction. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 61–71, 2002.

ATES, I. *et al.* Relationship between masked arterial hypertension and erectile dysfunction. **Angiology**, v. 16, n. April, p. 4–12, 2020.

BADGER, C. M. A. *et al.* Benzo-pyrones for reducing and controlling lymphoedema of the limbs. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2004, n. 2, 2004.

BAILEY, L. E.; ONG, S. D. Krebs-Henseleit solution as a physiological buffer in perfused and superfused preparations. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 1, n. 2, p. 171–175, 1978.

BANKS, E. *et al.* Erectile Dysfunction Severity as a Risk Marker for Cardiovascular Disease Hospitalisation and All-Cause Mortality: A Prospective Cohort Study. **PLoS Medicine**, v. 10, n. 1, p. e1001372, 29 jan. 2013.

BASSIOUNI, W. *et al.* Evaluation of some prostaglandins modulators on rat corpus cavernosum in-vitro: Is relaxation negatively affected by COX-inhibitors? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, n. October 2018, p. 1458–1466, 2019.

BECKER, A. J. *et al.* Possible role of bradykinin and angiotensin II in the regulation of penile erection and detumescence. **Urology**, v. 57, n. 1, p. 193–198, 2001.

BEHR-ROUSSEL, D. *et al.* Erectile dysfunction in spontaneously hypertensive rats: Pathophysiological mechanisms. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 3 53-3, p. 682–688, 2003.

BEHR-ROUSSEL, D. *et al.* Erectile dysfunction: an early marker for hypertension? A longitudinal study in spontaneously hypertensive rats. **AJP: Regulatory, Integrative and**

Comparative Physiology, v. 288, n. 1, p. R276–R283, 2004.

BELLA, A. J.; BRANT, W. O.; LUE, T. F. Physiology of Penile Erection and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **Color Doppler US of the Penis**, p. 15–20, 2007.

BILHIM, T. *et al.* Branching patterns of the male internal iliac artery: Imaging findings. **Surgical and Radiologic Anatomy**, v. 33, n. 2, p. 151–159, 2011.

BISCHOFF, E. Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition. **International Journal of Impotence Research**, v. 16, n. SUPPL. 1, p. 0–3, 2004.

BIVALACQUA, T. J. *et al.* Potentiation of erectile response and cAMP accumulation by combination of prostaglandin E1 and rolipram, a selective inhibitor of the type 4 phosphodiesterase (PDE 4). **Journal of Urology**, v. 162, n. 5, p. 1848–1855, 1999.

BIVALACQUA, T. J. *et al.* Endothelial Dysfunction in Erectile Dysfunction: Role of the Endothelium in Erectile Physiology and Disease. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 6 SUPPL., 2003.

BOER, R. *et al.* The inhibitory potency and selectivity of arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. **Molecular Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 1026–1034, 2000.

BOUTARI, C. *et al.* [PP.23.20] Prevalence and severity of erectile dysfunction in patients with resistant hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 34, p. e259, set. 2016.

BURNETT, A. L. *et al.* Erectile Dysfunction: AUA Guideline. **The Journal of urology**, v. 200, n. 3, p. 633–641, set. 2018.

BUSH, P. A. *et al.* Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. **Journal of Urology**, v. 147, n. 6, p. 1650–1655, jun. 1992.

CARNEIRO, F. *et al.* Audiovisual sexual stimulation improves diagnostic accuracy of penile doppler ultrasound in patients with erectile dysfunction. **Journal of Sexual Medicine**, v. 17, n. 2, p. 249–256, 2020.

CARRASCOSA, J. M.; PLANA, A.; FERRÁNDIZ, C. Effectiveness and safety of psoralen-uva (PUVA) topical therapy in palmoplantar psoriasis: A report on 48 patients. **Actas Dermosifiliográficas**, v. 104, n. 5, p. 418–425, 2013.

CHEN, J. *et al.* Effect of the plant-extract osthole on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue in vitro. **Journal of Urology**, v. 163, n. 6, p. 1975–1980, 2000.

CHIOU, W.; CHEN, J.; CHEN, C. Relaxation of corpus cavernosum and raised intracavernous pressure by berberine in rabbit. n. 155, p. 1677–1684, 1998.

CHITALEY, K.; WESSELLS, H. Vasculogenic mechanisms of erectile dysfunction. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 1, p. 105–110, 2004.

CHIUEH, C. C.; KOPIN, I. J. Hyperresponsivity of spontaneously hypertensive rat to indirect measurement of blood pressure. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 3, n. 6, 1978.

- CHOR, D. *et al.* Prevalence , Awareness , Treatment and Influence of Socioeconomic Variables on Control of High Blood Pressure : Results of the ELSA-Brasil Study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–14, 2015.
- CHUANG, A. T. *et al.* cGMP mediates corpus cavernosum smooth muscle relaxation with altered cross-bridge function. **Life Sciences**, v. 63, n. 3, p. 185–194, jun. 1998.
- CHUNG, E.; DE YOUNG, L.; BROCK, G. B. Investigative Models in Erectile Dysfunction: A State-of-the-Art Review of Current Animal Models. **Journal of Sexual Medicine**, v. 8, n. 12, p. 3291–3305, 2011.
- CORDEIRO, A. C. *et al.* Índice Internacional de Função Erétil Simplificado e doença coronariana em pacientes hipertensos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n. 4, p. 924–930, 2012.
- DE OLIVEIRA, M. G. *et al.* Mirabegron elicits rat corpus cavernosum relaxation and increases in vivo erectile response. **European Journal of Pharmacology**, v. 858, n. November 2018, p. 172447, 2019.
- DEAN, R. C.; LUE, T. F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **Urologic Clinics of North America**, v. 32, n. 4, p. 379–395, 2005.
- DELAY, K. J.; HANEY, N.; HELLSTROM, W. J. Modifying risk factors in the management of erectile dysfunction: a review. **The world journal of men's health**, v. 34, n. 2, p. 89–100, ago. 2016.
- DERBYSHIRE, E. R.; MARLETTA, M. A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. p. 533–562, 2012.
- DIEDERICHS, W. *et al.* Sympathetic inhibition of papaverine induced erection. **Journal of Urology**, 1991.
- DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.
- ESPÍRITO-SANTO, R. F. *et al.* The anti-inflammatory and immunomodulatory potential of braylin: Pharmacological properties and mechanisms by in silico, in vitro and in vivo approaches. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–20, 2017.
- FELDMAN, H. A. *et al.* Impotence and its medical and physiological correlates: results of the Massachusetts male aging study. **The Journal of Urology**, 1994.
- FERNANDES, M. A. V.; SOUZA, L. R. M. F. DE; CARTAFINA, L. P. Ultrasound evaluation of the penis. **Radiologia Brasileira**, v. 51, n. 4, p. 257–261, 23 jul. 2018.
- FISHER, J. P.; PATON, J. F. R. The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: Implications for hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 26, n. 8, p. 463–475, 2012.
- GHALAYINI, I. F. Nitric oxide – cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. p. 459–469, 2004.

- GIULIANO, F. *et al.* Antierectile role of the sympathetic nervous system in rats. **Journal of Urology**, v. 150, n. 2, p. 519–524, 1993.
- GIULIANO, F. A. *et al.* Prevalence of erectile dysfunction among 7689 patients with diabetes or hypertension, or both. **Urology**, v. 64, n. 6, p. 1196–1201, 2004.
- GOLDSTEIN, I. *et al.* Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. **Journal of Urology**, v. 167, n. 2 Part 2, p. 1197–1203, fev. 2002.
- GOLDSTEIN, I. *et al.* Epidemiology Update of Erectile Dysfunction in Eight Countries with High Burden. **Sexual Medicine Reviews**, v. 8, n. 1, p. 48–58, 2020.
- GRATZKE, C. *et al.* Anatomy, physiology, and pathophysiology of erectile dysfunction. **Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 1 PART 2, p. 445–475, 2010.
- GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Coumarins in the Rutaceae. **Phytochemistry**, v. 17, n. 5, p. 845–864, 1978.
- GUR, S. *et al.* Mirabegron causes relaxation of human and rat corpus cavernosum: could it be a potential therapy for erectile dysfunction? **BJU International**, v. 118, n. 3, p. 464–474, 2016.
- HALE, T. M. *et al.* Recovery of erectile function after brief aggressive antihypertensive therapy. **Journal of Urology**, v. 168, n. 1, p. 348–354, 2002.
- HAMADA, K.; MIKOSHIBA, K. New Insights into the Gating Mechanism of the IP 3 Receptor. **Messenger**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2019.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.
- HATZIMOURATIDIS, K. *et al.* Guidelines on male sexual dysfunction: erectile dysfunction and premature ejaculation. **European urology**, v. 57, n. 5, p. 804–14, maio 2010.
- HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO : cGMP-dependent protein kinases. v. 1676, p. 1671–1676, 2000.
- HOUSLAY, M. D.; ADAMS, D. R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: Modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. **Biochemical Journal**, v. 370, n. 1, p. 1–18, 2003.
- JANSAKUL, C. *et al.* Relaxant mechanisms of 3, 5, 7, 3', 4'-pentamethoxyflavone on isolated human cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1–3, p. 235–244, 2012.
- JOHNSON, J. *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 3, p. 397–404, set. 2017.
- KESSLER, A. *et al.* The global prevalence of erectile dysfunction: a review. **BJU International**, v. 124, n. 4, p. 587–599, 2019.

KIM, N. *et al.* A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 1, p. 112–118, 1991.

KIM, N. N. *et al.* Cross-regulation of intracellular cGMP and cAMP in cultured human corpus cavernosum smooth muscle cells. **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 4, n. 1, p. 10–14, 2000.

KLINGE, E.; SJÖSTRAND, N. O. Suppression of the excitatory adrenergic neurotransmission; a possible role of cholinergic nerves in the retractor penis muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 100, n. 3, p. 368–376, 1977.

KLONER, R. Erectile dysfunction and hypertension. **International Journal of Impotence Research**, v. 19, n. 3, p. 296–302, 2007.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Synthesis and antiinflammatory activity of coumarin derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 20, p. 6400–6408, 2005.

KONTOGIORGIS, C.; DETSI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Coumarin-based drugs: a patent review (2008 – present). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, n. 4, p. 437–454, 2012.

KOSTOVA, I. Synthetic and Natural Coumarins as Antioxidants. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 365–374, 2006.

KOUIDRAT, Y. *et al.* High prevalence of erectile dysfunction in diabetes: a systematic review and meta-analysis of 145 studies. **Diabetic Medicine**, v. 34, n. 9, p. 1185–1192, 2017.

LIN, T. T. *et al.* Prenylated coumarins: Natural phosphodiesterase-4 inhibitors from *toddalia asiatica*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 955–962, 2014.

LUE, T. F. *et al.* Summary of the recommendations on sexual dysfunctions in men. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 1, n. 1, p. 6–23, jul. 2004.

MANABE, K. *et al.* Pre-penile arteries are dominant in the regulation of penile vascular resistance in the rat. **International Journal of Impotence Research**, v. 12, n. 3, p. 183–189, 2000.

MATOS, M. J. *et al.* Coumarins — An Important class of phytochemicals. **Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health**, n. September, 2015.

MCCABE, M. P. *et al.* Incidence and prevalence of sexual dysfunction in women and men: a consensus statement from the fourth international consultation on sexual medicine 2015. **Journal of Sexual Medicine**, v. 13, n. 2, p. 144–152, 2016.

MINGORANCE, C.; ANDRIANTSITOHAINA, R.; ALVAREZ DE SOTOMAYOR, M. *Cedrelopsis grevei* improves endothelial vasodilatation in aged rats through an increase of NO participation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 76–83, 2008.

MONTAGUE, D. K. *et al.* Chapter 1: The management of erectile dysfunction: an AUA update. **The Journal of urology**, v. 174, n. 1, p. 230–239, 2005.

- MOREIRA, E. D. *et al.* Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: Results from a population-based cohort study in Brazil. **Urology**, v. 61, n. 2, p. 431–436, 2003a.
- MOREIRA, E. J. *et al.* Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Salvador , northeastern Brazil : a population-based study. p. 3–9, 2002.
- MOREIRA, E. J. *et al.* Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: Results from a population-based cohort study in Brazil. **Adult urology**, v. 4295, n. 2, p. 431–436, 2003b.
- MOREIRA JR ED, ABDO CHN, TORRES EB, LOBO CFL, F. J. Prevalência e fatores de risco da disfunção erétil no Brasil: resultados do estudo multicêntrico de comportamento sexual. **Rev Bras Med**, v. 58, p. 515–22, 2001.
- MORELAND, R. B.; GOLDSTEIN, I.; TRAISH, A. Sildenafil, a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. **Life Sciences**, v. 62, n. 20, p. PL309–PL318, abr. 1998.
- MORELLI, A. *et al.* Physiology of Erectile Function: An Update on Intracellular Molecular Processes{A figure is presented}. **EAU-EBU Update Series**, v. 4, n. 3–4, p. 96–108, 2006.
- NAKANE, M. *et al.* Activation of soluble guanylate cyclase causes relaxation of corpus cavernosum tissue: Synergism of nitric oxide and YC-1. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 2, p. 121–127, 2002.
- NEHRA, A. *et al.* Cavernosal expandability is an erectile tissue mechanical property which predicts trabecular histology in an animal model of vasculogenic erectile dysfunction. **Journal of Urology**, v. 159, n. 6, p. 2229–2236, 1998.
- NEVES, G. *et al.* Agentes dopaminérgicos e o tratamento da disfunção erétil. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 949–957, 2004.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.
- NIH CONSENSUS CONFERENCE. Impotence: NIH consensus development panel on impotence. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 270, n. 1, p. 83–90, 1993.
- NUNES, K.; WEBB, R. Mechanisms in erectile function and dysfunction: an overview. **Disease-Associated Mechanisms and Novel Insights into Therapy**, v. 51, n. 3, p. 22, 2012.
- OGER, S. *et al.* Combination of doxazosin and sildenafil exerts an additive relaxing effect compared with each compound alone on human cavernosal and prostatic tissue. **Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 3, p. 836–847, 2009.
- PAPATSORIS, A. G.; KORANTZOPOULOS, P. G. Hypertension, antihypertensive therapy, and erectile dysfunction. **Angiology**, v. 57, n. 1, p. 47–52, 2006.
- PAUVERT, O. *et al.* Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. **British Journal of**

Pharmacology, v. 139, n. 3, p. 513–522, 2003.

QIAO, X. H. *et al.* An experimental study: Evaluating the tissue structure of penis with 2D-ShearWave™ Elastography. **International Journal of Impotence Research**, v. 29, n. 1, p. 12–16, 2017.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Characterization of the L-arginine: Nitric oxide pathway in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, n. 2, p. 325–328, 1990.

RAKOTOARISON, O. *et al.* Vasorelaxing properties and bio-guided fractionation of *Cedrelopsis grevei*. **Planta Medica**, v. 69, n. 2, p. 179–181, 2003.

RALAY RANAIVO, H. *et al.* *Cedrelopsis grevei* induced hypotension and improved endothelial vasodilatation through an increase of Cu/Zn SOD protein expression. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 286, n. 2, p. H775-81, 2004.

RITCHIE, R.; SULLIVAN, M. Endothelins & erectile dysfunction. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 6, p. 496–501, 2011.

ROSEN, R. *et al.* (IIEF): A multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction. **Urology**, v. 4295, n. 97, 1997.

ROSENBLUM, J. D.; BOYLE, C. M.; SCHWARTZ, L. B. The mesenteric circulation: anatomy and physiology. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 2, p. 289–306, 1997.

RUIZ RUBIO, J. L. *et al.* Mechanisms of prostaglandin E1 induced relaxation in penile resistance arteries. **Journal of Urology**, v. 171, n. 2 I, p. 968–973, 2004.

SALAHDEEN, H. M. *et al.* The relaxant actions of ethanolic extract of *Tridax procumbens* (Linn.) on rat corpus cavernosum smooth muscle contraction. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 211–216, 2015.

SATTAR, A. A. *et al.* Cavernous oxygen tension and smooth muscle fibers: relation and function. **The Journal of Urology**, v. 154, n. 5, p. 1736–1739, 1995.

SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: Mechanisms and treatment. **Hypertension**, v. 59, n. 2 SUPPL. 1, p. 367–374, 2012.

SELVIN, E.; BURNETT, A. L.; PLATZ, E. A. Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US. **The American journal of medicine**, v. 120, n. 2, p. 151–7, fev. 2007.

SHOKOOHINIA, Y. *et al.* Comparative evaluation of cytotoxic and apoptogenic effects of several coumarins on human cancer cell lines: osthole induces apoptosis in p53-deficient H1299 cells. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2014, 2014.

SILVA, F. H. *et al.* Sympathetic hyperactivity, increased tyrosine hydroxylase and exaggerated corpus cavernosum relaxations associated with oxidative stress plays a major role in the penis dysfunction in Townes sickle cell mouse. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–17, 2016.

SIMOPOULOS, E. F.; TRINIDAD, A. C. Male erectile dysfunction: Integrating psychopharmacology and psychotherapy. **General Hospital Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 33–38,

2013.

SUN, P.; SWINDLE, R. Are men with erectile dysfunction more likely to have hypertension than men without erectile dysfunction? A naturalistic national cohort study. **Journal of Urology**, v. 174, n. 1, p. 244–248, 2005.

TANAKA, Y. *et al.* Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1602–1608, 1999.

TARUKALLO, N.; RASYID, H. Anti-hypertensive drugs and sexual dysfunction in men. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 01, p. 1–11, 5 fev. 2020.

TERRETT, N. K. *et al.* Sildenafil (VIAGRATM), a potent and selective inhibitor of type 5 cGMP phosphodiesterase with utility for the treatment of male erectile dysfunction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 15, p. 1819–1824, ago. 1996.

THOMPSON, I. M. *et al.* Erectile dysfunction and subsequent cardiovascular disease. **JAMA**, v. 294, n. 23, p. 2996, 21 dez. 2005.

TOULOUPIDIS, S. *et al.* Acenocoumaral associated priapism: Report of a case. **Andrologia**, v. 36, n. 1, p. 47–49, 2004.

TRAISH, A. *et al.* Phentolamine mesylate relaxes penile corpus cavernosum tissue by adrenergic and non-adrenergic mechanisms. **International Journal of Impotence Research**, v. 10, n. 4, p. 215–223, 1998.

TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. **Circulation Research**, v. 48, n. 3, p. 309–319, mar. 1981.

TSAI, I. L. *et al.* Anti-platelet aggregation constituents from Formosan *Toddalia asiatica*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1377–1382, 1998.

TUDORIU, T.; BOURMER, H. The hemodynamics of erection at the level of the penis and its local deterioration. **Journal of Urology**, v. 129, n. 4, p. 741–745, 1983.

USHIYAMA, M. *et al.* Erectile dysfunction in hypertensive rats results from impairment of the relaxation evoked by neurogenic carbon monoxide and nitric oxide. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 27, n. 4, p. 253–61, 2004.

WALLIS, R. M. *et al.* Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. **American Journal of Cardiology**, v. 83, n. 5 A, p. 3–12, 1999.

WHO. **Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020**. [s.l: s.n.].

WILLIAMS, B. *et al.* ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**, v. 39, n. 33, p. 3021–3104, 1 set. 2018.

YOUSIF, M. H. M.; BENTER, I. F. Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in regulation of corporal smooth muscle tone in diabetic and older rats. **Vascular Pharmacology**, v. 47, n. 5–6, p. 281–287, 2007.

YUGAR-TOLEDO, J. C. *et al.* Posicionamento brasileiro sobre hipertensão arterial resistente – 2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 3, p. 576–596, 2020.

YUN, S. H. *et al.* Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 10–15, 2016.