

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO CRÔNICA
DO ÓXIDO NÍTRICO NA REPRODUÇÃO
DE RATOS MACHOS**

Adriana da Rocha Tomé

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do
Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título
De Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Fortaleza

2002

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta instituição.

Defesa Formal aprovada em

Adriana da Rocha Tomé

Banca Examinadora:

Professor Dr. Viela Satyanarayana Rao
Orientador

Co-orientador Professor Dr. Manasses Claudino Fonteles

Professor Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Professor Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas
(UECE)

Professor Dr. Marcus Raimundo Vale

T618e

Tomé, Adriana da Rocha

Estudo dos efeitos da inibição crônica do óxido nítrico na reprodução de ratos machos / Adriana da Rocha Tomé. – Fortaleza, 2002.

113f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará.
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Óxido nítrico – processo reprodutivo.

I. Título

CDD 591.16

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	6
1. Revisão de Literatura	8
1.1 Histórico	8
1.2 Biosíntese do NO	11
1.3 Transporte de NO e Mecanismo de Ação Biológico	16
1.4 Inibidores da NO sintetase	19
1.5 O Papel do NO na Reprodução	24
1.6 O Papel do NO na Reprodução Feminina	25
1.6.1 Função Ovariana	25
1.6.2 Função do Oviduto	25
1.6.3 Função Uterina e Vaginal	26
1.7 O Papel do NO na Reprodução Masculina	28
1.7.1 Óxido Nítrico e Regulação da Ereção Peniana	28
1.7.2 Óxido Nítrico e Função Testicular	35
1.7.3 Óxido Nítrico e Motilidade Espermática	37
1.7.4 Óxido Nítrico e Espermatogênese	37
1.7.5 Controle Hormonal da Espermatogênese	40
1.7.6 Óxido Nítrico e Esteroidogênese	40
1.7.7 Óxido Nítrico e Comportamento Sexual	44
2 - OBJETIVOS	46
2.1 - OBJETIVO GERAL	46
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 – Materiais	47
3.1.1 - Animais	47
3.1.2 – Drogas e Reagentes	47
3.1.3 - Aparelhos e Materiais	47
3.2 – Métodos	49
3.2.1 - Descida Testicular	49
3.2.2 - Emissão Seminal Induzida pela Pilocarpina	49
3.2.2.1 – Dosagem de Nitrito/Nitrato	51
3.2.3 – Inibição Crônica da Óxido Nítrico Sintetase (NOS)	51
3.2.3.1 – Medição da Pressão Arterial	52
3.2.3.2 – Comportamento Sexual	53
3.2.3.2.1 - Ooforectomia	53
3.2.3.3 - Fertilidade	54
3.2.3.4 – Pesos Corporais e Pesos Relativo dos Órgãos	54
3.2.3.5 – Histologia Testicular	55
3.2.3.5.1 - Microscopia Óptica	55
3.2.3.5.2 - Microscopia Eletrônica	55
3.2.3.5 – Morfologia e Concentração Espermática	56
3.2.3.6 - Dosagem de Testosterona Plasmática	57

3.2.3.7 – Análise Estatística	57
4 – RESULTADOS	58
4.1 - Descida Testicular	58
4.2 – Emissão Seminal	59
4.2.1 – Emissão seminal induzida por pilocarpina	59
4.2.2 – Efeito da atropina e do L-NAME na emissão seminal induzida pela pilocarpina	60
4.2.3 – Reversão pela L-arginina e nitroprussiato de sódio da emissão seminal induzida pela pilocarpina	61
4.2.4 – Dosagem de nitrito/nitrato	62
4.3 – Inibição crônica da óxido nítrico sintetase	63
4.3.1 – Medição da pressão arterial	63
4.3.2 – Efeito da inibição crônica da NOS no comportamento sexual de ratos machos	64
4.3.3.- Efeito da inibição crônica da NOS na fertilidade de ratos machos	67
4.3.4.- Peso corporal e peso relativo do epidídimo, próstata e vesícula seminal.	68
4.3.5. – Histologia Testicular	70
4.3.5.1. – Microscopia Óptica	70
4.3.5.2.- Microscopia Eletrônica	72
4.3.6 -Morfologia e Concentração Espermática	75
4.3.7.- Dosagem de Testosterona Plasmática	79
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

RESUMO

O óxido nítrico (NO), derivado da L-arginina pela óxido nítrico sintetase (NOS), a qual existe em várias isoformas, é considerado um importante mensageiro molecular em vários órgãos incluindo o trato genital masculino. Este estudo analisou o possível efeito do L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil éster), um inibidor não seletivo de NOS sobre a descida testicular, emissão seminal induzida por colinérgico, função testicular, comportamento sexual e fertilidade em ratos Wistar machos. O tratamento de ratos machos de 20 dias de idade com L-NAME na dose de 20mg/kg/dia por 10 dias consecutivos promoveu um significativo retardo na descida testicular comparado ao controle que recebeu salina. Este efeito do L-NAME foi bloqueado em animais pré-tratados com L-arginina (600mg/kg, s.c.), um substrato para a biossíntese de NO, sugerindo que o NO exerce um papel modulador na descida testicular. Em ratos machos adultos, a pilocarpina (0,75 e 3,0 mg/kg, i.p.), droga colinérgica, induziu a emissão seminal de maneira dose-dependente. A emissão seminal em resposta a pilocarpina (3,0 mg/kg) foi diminuída em animais atropinizados sugerindo um efeito colinérgico. L-NAME também inibiu a emissão seminal induzida por pilocarpina e este efeito foi revertido por L-arginina (600mg/kg, s.c.) ou pela administração conjunta de nitroprussiato de sódio (0,5mg/kg, s.c.). Além disto, a análise urinária de nitrato/nitrito demonstrou marcada alteração em concordância com o tratamento. Estes resultados sugerem que o NO participa na neurotransmissão inibitória responsável pela emissão seminal em ratos estimulados com pilocarpina. Em experimentos realizados para verificar os efeitos da inibição crônica de NOS sobre o comportamento copulatório, o tratamento de ratos com L-NAME (40mg/kg/dia) durante um período de um ciclo completo de espermatogênese uma influência inibitória sobre o comportamento sexual foi evidenciada por um aumento na latência da primeira monta e intromissão e marcada inibição da frequência de intromissão e ejaculação. A inibição crônica de NOS também demonstrou alteração na função testicular refletida pela diminuição nos níveis séricos de testosterona, contagem de

espermatozóides e anormalidades espermáticas. O número de fêmeas grávidas, de machos que receberam tratamento crônico com L-NAME, foi reduzido resultando em 75% de inibição da fertilidade. O efeito de L-NAME sobre a fertilidade masculina pode dever-se a inibição da NOS periférica e central promovendo inibição da secreção local de androgênios e/ou gonadotrofinas. Os resultados mostram evidências que o NO regula de maneira importante o processo reprodutivo masculino tais como descida testicular, comportamento sexual e fertilidade.

ABSTRACT

Nitric Oxide (NO) derived from L-arginine by the nitric oxide synthase (NOS) which is expressed by various isoforms, is considered to be an important messenger molecule in several organ systems including the male genital tract. This study analysed the possible effects of L-NAME (N^G-nitro-L-arginine methyl ester), a nonselective NOS inhibitor on testicular descent; cholinergic stimulation-induced seminal emission; testicular function; sexual behaviour; and on fertility of male Wistar rats. Treatment of 20 days old male rats with L-NAME at 20mg/kg/day for 10 consecutive days caused a significant delay in the testes descent compared to controls that receives only normal saline. This effect of L-NAME was fully reversed in animals pretreated with L-arginine (600mg/kg, s.c.), a substrate for NO biosynthesis, suggesting stimulant drug pilocarpine (0.75 – 3.0 mg/kg, i.p.) induced a dose-related seminal emission. The seminal emission response to 3.0mg/kg of pilocarpine was greatly diminished in atropinized animals, suggesting a cholinomimetic effect. L-NAME, also inhibited the pilocarpine-induced seminal emission which could be reversed by L-arginine (600mg/kg, s.c.). Further, urine analysis for nitrate/nitrite metabolites showed marked alterations in accordance to the drug treatments. These results suggest that NO mediates the inhibitory neurotransmission responsible for seminal emission in pilocarpine stimulated rats. In experiments carried out to verify the effects of chronic NOS inhibition on copulatory behavior, treatment of rats with L-NAME (40mg/kg/day) for a period of one complete spermatogenic cycle caused an inhibitory influence on sexual behavior as evidenced by an increase in the first mount and intromission latencies and marked inhibitions of the intromission and ejaculation frequencies. Chronic NOS inhibition further evidenced impaired testicular function, reflected by decreases in serum levels of testosterone, epididymal sperm counts and sperm abnormalities. The number of females impregnated with males that received chronic L-NAME treatment was highly reduced, resulting in 75% inhibition of fertility. The adverse influence of

L-NAME on male infertility could be due to NOS inhibition at both peripheral and central sites causing inhibition of local androgen and/or gonadotropin secretions. These results provide evidence that NO importantly regulates male reproductive processes such as testicular descent, sexual behavior and fertility.

1. Revisão de Literatura

1.1 Histórico

Em 1916, Mitchell et al., observaram que o óxido de nitrogênio era produzido em mamíferos. Essa observação foi confirmada posteriormente por Tannenbaum et al. (1928). O óxido nítrico é extremamente lábil, sua meia-vida no organismo é de 5-10 segundos e depois é convertida, na presença de água e oxigênio, em nitratos e nitritos. Apesar dos seres humanos excretarem nitratos, os cientistas sempre acharam que este era derivado apenas da dieta. Em 1956, Magge and Barnes do conselho de pesquisas médicas de Surrey, Inglaterra, relataram que o organismo humano converte nitratos de alimentos curados em nitrosaminas carcinogênicas. Em 1981, Steven Tannenbaum e seus colaboradores no Instituto de Tecnologia de Massachusetts (MIT), observaram que seres humanos e ratos alimentados com dieta contendo níveis baixos de nitratos continuavam a excretar quantidades substanciais de nitratos, concluindo que a dieta não era a única fonte de nitratos. Tannenbaum encontrou uma pista valiosa em um de seus pacientes. O mesmo excretava níveis muito altos de nitratos no período em que se encontrava com uma diarreia infecciosa. O processo inflamatório associado com a diarreia era aparentemente responsável pela formação de nitrato. Em um trabalho posterior, Tannenbaum observou, que injeções de endotoxina bacteriana incrementava em muito a excreção de nitratos em ratos. A fonte precisa da formação de nitrato foi descoberta por Michael Marletta da Universidade de Michigan, quando da orientação de seu aluno

Dennis Stueher da Universidade de Utah. Marletta foi aluno de Tannenbaum no MIT e continuava intrigado a respeito do papel do sistema imunológico na formação de nitrato. Marletta descobriu que uma cepa de camundongos com deficiência de macrófagos induzida geneticamente excretava quantidades muito baixas de nitratos e estabeleceu uma relação entre a presença de macrófagos e a excreção de nitratos. Estudando macrófagos em cultura, descreveu a relação entre a adição de endotoxina bacteriana e interferon gama com a produção de nitrato pelos macrófagos constatando que, através da manipulação do meio de cultura na ausência de L-arginina, os macrófagos perdiam a habilidade de produzir nitratos. John Hibbs et al. (1987) trabalhando independentemente demonstrou, que macrófagos só conseguiam destruir células tumorais em cultura na presença de arginina e que a mesma era convertida em nitrato e citrulina. A partir desta descoberta ele considerou, que o óxido nítrico era produzido por uma enzima presente no macrófago, que se utilizava de L-arginina como substrato e produzindo citrulina, sendo o primeiro pesquisador a sintetizar um análogo da L-arginina para bloquear esta enzima. O derivado metilado da L-arginina foi capaz de inibir a capacidade dos macrófagos de gerar óxido nítrico e assim destruir células tumorais, fungos e bactérias.

Numa série de investigações não-relacionadas, pesquisadores identificaram o óxido nítrico como uma molécula mensageira intracelular. Existem duas etapas deste aspecto da história do óxido nítrico. A primeira etapa diz respeito ao detalhamento de como neurotransmissores dilatam vasos sanguíneos e a segunda é concernente ao estudo de drogas dilatadoras

coronarianas utilizadas no tratamento sintomático da angina. Furchgott, um farmacologista cardiovascular trabalhando no *Medical Center Downstate* no Brooklyn em Nova York, USA e Zawadski (1980), forneceram evidências que o relaxamento de anéis vasculares induzido pela acetilcolina era mediado por um fator relaxante derivado do endotélio (FRDE). Inúmeros investigadores, incluindo o próprio Furchgott e Ignarro, da Universidade da Califórnia, tentaram isolar sem sucesso o fator relaxante derivado do endotélio, no entanto, demonstraram que o mesmo aumenta os níveis intracelulares de GMPc no músculo liso vascular. Neste meio tempo, investigadores como Ferid Murad, na Universidade da Virgínia, estavam tentando entender os mecanismos da eficácia da nitroglicerina no tratamento de ataques cardíacos. Em 1977, Murad e seus colaboradores então na Universidade de Stanford descobriram, que a nitroglicerina e outros nitratos orgânicos são pró-drogas, que se tornam ativas quando convertidas metabolicamente a óxido nítrico e que os mesmos relaxavam os vasos aumentando os níveis de GMPc (Katsuki et al, 1977). Em 1986, tanto Furchgott como Ignarro especularam, que o óxido nítrico ou uma molécula quimicamente relacionada, eram o fator de relaxamento derivado do endotélio. Independentemente, Palmer et al. (1987) e Ignarro et al. (1987), forneceram evidências que o FRDE era o óxido nítrico (NO). Um ano depois, Palmer et al. (1988) publicaram que o NO era sintetizado no endotélio a partir da L-arginina, formando no processo, a citrulina.

Garthwaite et al. (1988), trabalhando no Royal College of London, encontraram evidências para a presença e síntese de NO no cérebro. Estes

achados foram confirmados por David Bredt e Solomon Snyder (1989) no Johns Hospkin Hospital de Baltimore, Maryland, USA, que localizaram as regiões onde a óxido nítrico sintetase neuronal se expressava e caracterizara o óxido nítrico como um neurotransmissor central e periférico, do tipo não adrenérgico não colinérgico (NANC), em fibras neuronais no trato intestinal e genitourinário, que passaram a se denominar fibras nitrérgicas.

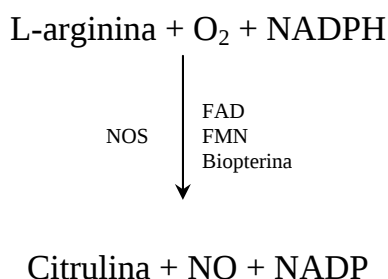
Durante o período de 1989 até hoje, foram realizadas inúmeras pesquisas sobre a biologia e função do NO com mais de 10.000 publicações neste campo por ano e em 1992 o óxido nítrico foi nomeado como “Molécula do Ano” por parte dos editores da revista Science. A descoberta desta molécula como um neurotransmissor, mensageiro celular e efector da resposta imune celular revolucionou vários campos da medicina, principalmente nas áreas de fisiologia, patologia, farmacologia básica e clínica, neurologia, imunologia e reprodução.

1.2 Biosíntese do NO

O NO é um radical livre gasoso inorgânico formado pela óxido nítrico sintetase (NOS), numa reação que combina oxigênio molecular com o nitrogênio terminal do aminoácido L-arginina, liberando L-citrulina. A NOS requer não somente esses substratos , mas também outras co-enzimas/cofatores como a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a nicotinamida fosfato de adenina dinucleotídeo (NADPH), tetrahydrobiopterina (THB₄) e calmodulina (Bredt & Snyder, 1994; Palmer et al., 1988b; Moncada et al., 1989; Moncada, 1992)

(Figura 1).

a



b

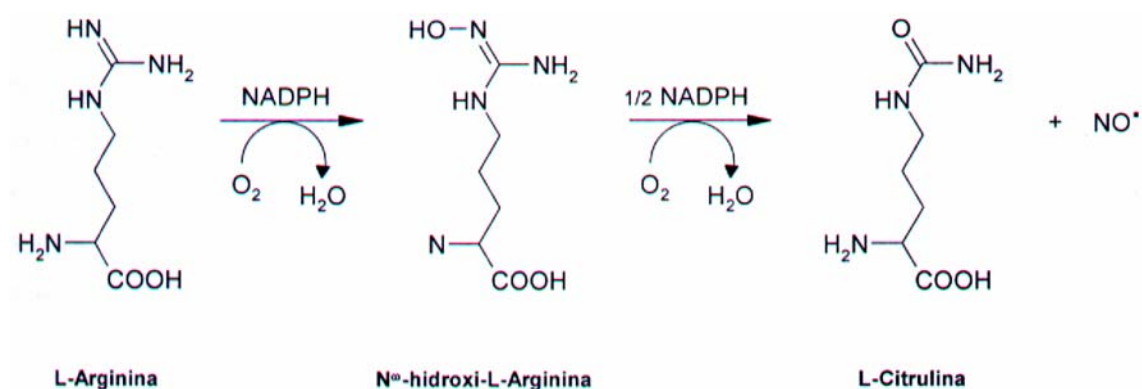


Figura 1. Síntese do NO. No painel (a) é mostrado um esquema geral com substratos, enzima, cofatores e principais produtos da via L-arginina-NO. Um esquema das reações de oxidação mostrando as estruturas químicas primárias é mostrado no painel (b). Os inibidores da NOS agem como falso substrato, substituindo a L-arginina no processo.

A NOS existe em três isoformas. A NOS cerebral (NOSb) ou neuronal (NOSn NOS1) e endotelial NOS (NOSc ou NOS3), também referida como NOS constitutiva (NOSc), são responsáveis pela liberação basal de NO, sendo ambas cálcio/calmodulina dependente para sua ativação (Griffith & Stuehr, 1995; Snyder, 1995). A atividade dessas duas diferentes isoformas de NOS podem ser reguladas por hormônios sexuais (Weiner et al., 1994).

Uma terceira isoforma é a forma cálcio-independente (NOS_i ou NOS₂), que é expressa somente em resposta a citocinas inflamatórias ou lipopolissacarídeos (LPS) (Nussler & Billiar, 1993; Morris & Billiar, 1994). As três isoformas da NOS são produtos de genes separados, entretanto com homologia de 50 a 60% dos aminoácidos (Nathan & Xie, 1994).

Entretanto, as três isoformas presumivelmente funcionam como um homodímero durante a ativação, compartilhando de domínio carboxi-terminal redutase homólogo a citocromo P-450 redutase e um domínio amino terminal oxigenase contendo um grupo heme prostético, que são ligados ao meio da proteína por um domínio ligador de calmodulina (Dinerman et al., 1993; Abu-Soud et al., 1994; Sessa, 1994; Su et al., 1995).

O domínio redutase das três isoformas de NOS contém tetraidrobiopterina (THB), que é requerida para a geração eficiente de NO e necessário para manter uma conformação estável para o transporte de elétrons, provavelmente por promover uma homodimerização (Klatt et al., 1995; Tzeng et al., 1995; Ghosh et al., 1996) (Figura 2).

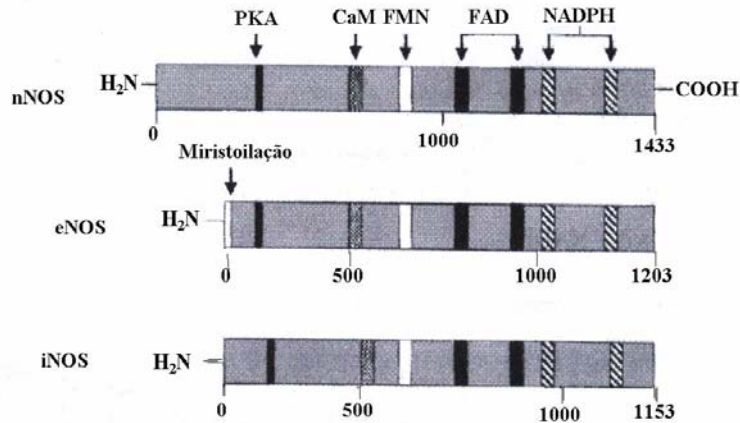


Figura 2. Isoformas da Óxido Nítrico Sintetase (NOS)

Aumentos da concentração intracelular de cálcio disparam uma cascata de eventos levando a ativação de NOS_c e síntese de NO. O cálcio intracelular se liga a calmodulina para formar o complexo cálcio-calmodulina e regular a ligação de calmodulina ao domínio trava (“latch domain”), que permite a transferência de elétrons do NADPH via grupos de flavinas, através do domínio redutase de um sítio ativo contendo heme, facilitando a conversão de O₂ e L-arginina para NO e L-citrulina (Abu- Soud et al., 1994; Su et al., 1995; Siddhanta et al., 1996).

Em contraste com NOS_c, a NOS_i não requer um aumento intracelular de cálcio (Cho et al., 1992). Quelantes de cálcio têm mostrado serem redutores da atividade de NOS_c; contudo, com vistas a atividade de NOS_i, o papel do cálcio permanece pouco claro. Gellar et al. (1993), afirmam que quelantes de cálcio significativamente reduziram a atividade NOS_i, enquanto Charles et al. (1993), afirmam que a atividade NOS_i não é influenciada pelos quelantes de cálcio.

Excluindo o cálcio, diversos outros fatores podem regular a atividade da

NOS. Mecanismos pré e pós traducionais e transcrpcionais têm demonstrado serem reguladores da expressão de todas as isoformas de NOS (Kelly et al., 1996). Embora a NOSi seja citosólica, a NOSc possui sítio de miristilação, capacitando-a de se ligar a membrana celular (Busconi & Michel, 1993). A fosforilação da NOSc pela proteína quinase C e A está associada com o desligamento da enzima da membrana celular e perda de atividade (Bredt et al., 1992; Michel et al., 1993). Existem também, sítios potenciais de fosforilação na NOSi (Geller et al., 1993); contudo, não tem sido demonstrado um significado funcional para estes sítios.

A associação aparente das três isoenzimas NOS com o endotélio (NOSe), neurônios (NOSn) e com necessidade de indução (NOSi) é uma simplificação didática de apresentação das mesmas. Por exemplo, a NOSe é localizada não apenas nas células endoteliais vasculares mas também em plaquetas (Radomski et al., 1990) e em certas populações neuronais no cérebro (Dinerman et al., 1994), enquanto a NOSn foi encontrada no epitélio bronquiolar e na traquéia (Kobzik et al., 1993), e também no músculo esquelético (Kobzik et al., 1994). Além do mais, algumas diferenças tem sido identificadas entre NOSi obtidas de diferentes tecidos dentro de uma mesma espécie animal (Mohaupt et al., 1994). Ademais, a NOSe (constitutiva) pode ser induzida em certas circunstâncias como durante exercitação crônica (Sessa et al., 1994) ou durante a gravidez, quando tanto NOSe quanto a NOSi são induzidas (Weiner et al., 1994), enquanto em alguns tecidos a NOSi é expressa constitutivamente, como no epitélio bronquial humano (Kobzik et al., 1993), no rim de rato (Mohaupt et al., 1994) e em

alguns tecidos fetais (Baylis et al., 1994).

A L-arginina é o único doador fisiológico de nitrogênio e substrato essencial para a determinação da taxa de geração de NO. A arginina é sintetizada a partir da citrulina por ação da argininosuccinato sintetase (Morris & Billiar, 1994; Nussler et al., 1994). O transporte da arginina para dentro da célula é fator limitante da atividade NOS (Sax et al., 1988).

Inibidores competitivos da arginina como o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) ou o N-monometil-L-arginina (L-NMMA) promovem a diminuição da atividade enzimática da NOS (Bogle et al., 1992). Assim, a síntese e transporte da arginina representam alvos potenciais para experimentação e manipulação da síntese de NO celular (Rosselli et al., 1998).

Tem-se demonstrado que a NOS é geradora de peróxido de hidrogênio, superóxido, bem como de NO (Heinzel et al., 1992). Superóxidos (O_2^-) gerados em baixas concentrações de L-arginina reagem com o NO, resultando em aumento da geração de peroxinitrito ($ONOO^-$) e consequente toxicidade celular. Essas reações são bloqueadas por inibidores de NOS como o L-NAME (Xia et al., 1996).

1.3 Transporte de NO e Mecanismo de Ação Biológico

Inicialmente, acreditava-se que o NO alcançava seu alvo intracelular através da livre difusão pela membrana da célula. Contudo, devido a sua curtíssima meia-vida (< 30 s) e sua alta reatividade com o O_2^- , ferro heme e não-

heme, o conceito de difusão passiva do NO foi difícil de ser aceito. Devido a reação do NO com os grupos tiol (-SH) de proteínas, esta molécula pode formar compostos S-nitrosil estáveis e biologicamente ativos (Stamler et al, 1992). De fato, tem-se demonstrado que o NO circula na forma de albumina S-nitrosilada e possui atividades biológicas idênticas as do NO *in vitro* e *in vivo* (Keaney et al., 1993). Desde que os compostos ferro-nitrosil são associados com ligantes de tiol, a formação do ferro-dinitrosil cisteína tem sido sugerido como uma segunda via para o transporte de NO (Mulsch et al., 1993).

Atualmente, o NO é tido como mediador de múltiplos efeitos biológicos, embora inicialmente tenha-se acreditado, que os efeitos do NO fossem mediados somente via ativação da guanilato ciclase e conseqüentemente, da 3', 5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc atua como mediador no relaxamento, inibidor do crescimento de célula muscular lisa vascular e na prevenção da agregação plaquetária e aderência de neutrófilos às células endoteliais (Murad, 1994).

Contudo, estudos recentes sugerem que o NO pode, também, induzir seus efeitos biológicos por vias GMPc independentes. Sendo o NO paramagnético, esta molécula possui alta capacidade de formação de complexo nitroso de alta afinidade com vários complexos metálicos (Lancaster et al., 1992). Além disso, liga-se aos grupos tiol (-SH) da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH), e via este mecanismo o NO diminui a atividade glicolítica associada ao infarto do miocárdio, falhas na reperfusão e neurotoxicidade, além da inibição da respiração mitocondrial (Moncada et al., 1991). Outro mecanismo

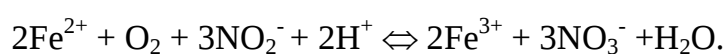
relevante pode incluir a S-nitrosilação dos tiois, formação de nitrotirosina e ligação do NO ao heme protéico da cadeia respiratória (McDonald & Moss, 1993; Mohr et al., 1996).

O NO apresenta ação inibidora da atividade de GADPH através de ligação covalente ao NAD ou ao NADH. Esta molécula também pode agir como um radical livre seqüestrador e inativar radicais superóxido (O_2^-), prevenindo a toxicidade celular (Cook & Tsao, 1993). Contudo, sob condições apropriadas, a reação do NO com o O_2^- pode resultar na geração de peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente oxidante celular (Beckman et al., 1990; Beckman & Crow, 1993). O peroxidonitrito se decompõe para formar o radical hidroxil reativo HOONO. Peroxinitrito e seus metabólitos são capazes de induzir citotoxicidade por peroxidação lipídica, nitrosilação de várias moléculas de tirosina quinase, que regulam o funcionamento da enzima e sua via de transdução de sinal e promovem, também, inativação de canais de Na^+ .

Juntos, estes achados sugerem que a ação do NO numa célula depende de sua concentração, estado redox celular e abundância de metais, proteínas tiol e tióis de baixo peso molecular (glutathiona), bem como outros alvos nucleofílicos (Davies et al., 1995).

Do ponto de vista biológico, as reações químicas mais importantes do NO são aquelas com o oxigênio em suas várias formas “redox” e com metais de transição. A reação do NO com O_2 forma dióxido nítrico (NO_2), o qual dimeriza para formar N_2O_4 . Este último sofre uma dismutação espontânea em solução aquosa a um pH de 7.4 para gerar os produtos finais estáveis nitrito (NO_2^-) e

nitrato (NO_3^-) (Moncada et al., 1991; Lewis e Deen, 1994). Na presença de tecidos biológicos a meia vida do NO é de 3-5s (Moncada, 1991; Ignarro et al., 1993). Numerosas interações químicas com oxigênio, ânion superóxido e outros radicais derivados do oxigênio e oxihemoproteínas (Ignarro et al., 1993). No entanto, o NO gerado no organismo é convertido quase que completamente a nitrato, uma vez que nitritos reagem com a oxihemoglobina (Ignarro, 1993) segundo a seguinte reação:



A estimativa quantitativa de NO_2^- e NO_3^- em amostras biológicas aquosas é usada como uma medida indireta do NO produzido endogenamente (Archer, 1993; Schulz et al., 1999).

1.4 Inibidores da NO sintetase

Desde a descoberta da via arginina/NO, a utilização de inibidores da NOS tem demonstrado ser uma importante ferramenta no estudo da fisiologia, farmacologia e até mesmo fisiopatologia dos diversos agravos que envolvem esta enzima (Pinto, 1999).

Vários compostos foram descritos como capazes de inibir a síntese de NO, atuando por diferentes mecanismos como antagonismo pelo sítio catalítico da enzima (análogos da L-arginina) (Hibbs et al., 1987; Moore et al., 1990), antagonismo da calmodulina (Bredt & Snyder, 1990; Win et al., 1996) e antagonistas que agem no sítio de ligação da flavina-adenina-dinucleotídeo

(Stuehr et al., 1991).

Antes da descoberta do NO com um mediador biológico, demonstrou-se que um análogo da arginina a N^ω-monometil-L-arginina preveniu a citotoxicidade de macrófagos contra células tumorais (Hibbs et al., 1990). Subsequentemente, demonstrou-se que este composto é um inibidor competitivo da formação de NO na vasculatura e em outros sítios (Moncada et al., 1989). Muitos outros análogos da L-arginina são hoje conhecidos por agirem como inibidores competitivos (algumas vezes irreversivelmente) tanto das isoformas constitutivas como induzidas. Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas, em graus variáveis, por análogos da L-arginina substituídos no grupamento guanidino (Mayer e Andrew, 1998; Boucher et al., 1999). Alguns análogos da L-arginina exibem certa seletividade por determinada isoforma, geralmente sobre as isoformas constitutivas. A N^ω-ciclopropil-L-arginina, por exemplo, inibe com maior potência a NOS_n em relação a NOS_i in vitro (Lambert et al., 1992), enquanto que o N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) apresenta seletividade sobre a NOS_e após hidrólise. Já o N^ω-amino-L-arginina não é seletivo para nenhuma das isoformas (Gross et al., 1990; Gross et al., 1991; Lambert et al., 1991; Lambert et al., 1992; Furfine et al., 1993). Os mecanismos de inibição da NOS induzida por estes compostos variam, porém todos envolvem a ocupação do sítio ligante para o substrato.

Além dos análogos da L-arginina, vários compostos heterocíclicos como o 7-nitroindazol (7-NI) também são capazes de inibir a NOS (Moore et al., 1993;

Mayer e Andrew, 1998; Boucher et al., 1999). Ao contrário de outros

inibidores seletivos de NOSn, a base para sua seletividade envolve uma captação diferencial deste inibidor pelos neurônios em comparação ao endotélio. Este composto apresenta efeitos cardiovasculares discretos *in vivo*, apesar de ser um potente inibidor da atividade da NOS em homogenados de células endoteliais (Babbedge et al., 1993; Moore et al., 1993; Wolff et al., 1994).

Aminoácidos que compartilham com a arginina a porção guanilínica, também possuem a capacidade de inibir a NOS. Entre estes merecem destaque o N^G-N^G- dimetil-L-arginina (L-ADMA), o N-monometil-L-arginina (L-NMMA) e o N^G-N^G'- dimetil-L-arginina (L-SDMA), que são naturalmente encontrados nos organismos vivos (Vallance et al. 1992). O ADMA e SDMA são encontrados livres no citosol celular. Provavelmente esses aminoácidos são frutos do “turnover” de proteínas, porém podem ser captados a partir do meio extracelular através do transporte de L-arginina (Bogle et al., 1995). O papel destes aminoácidos como inibidores naturais da NOS foi melhor caracterizado com a descoberta de uma enzima capaz de metabolizá-los à citrulina, a dimetil-amino-hidrolase (DDAH), o que possibilitou especular sobre a possibilidade de se modular a atividade da NOS a partir da concentração desses aminoácidos pela DDAH (McAlister et al., 1996; McAlister & Vallance, 1998).

Outro composto foi sugerido como inibidor natural da NOS. Trata-se de um peptídeo de 89 aminoácidos, a proteína inibitória da NOSn (PIN). A proteína humana apresenta alta homologia com a de rato (100%), sugerindo, assim, participar de funções altamente conservadas ao longo da evolução. Sequência de ligação com essas moléculas só foi observada na isoforma neuronal da NOS.

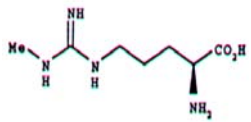
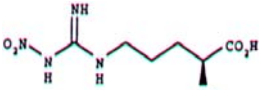
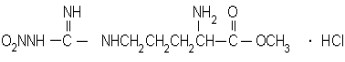
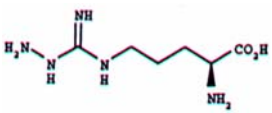
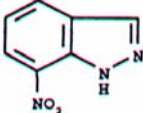
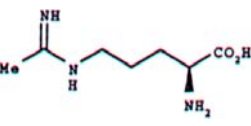
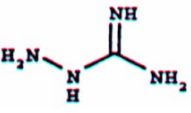
Nesta enzima, o provável mecanismo de inibição repousa sobre a capacidade da PIN em evitar a dimerização da NOSn, entretanto, de modo diferente do observado com o 7-nitro-imidazol (7-NI) (Jaffrey & Snyder, 1997).

Dentre os compostos sugeridos como inibidores da NOS, o N-imioetil-L-ornitina (L-NIO), um substituto imidazólico da ornitina, projeta-se pela capacidade de inibir irreversivelmente esta enzima, com potência cinco vezes superior à observada entre os compostos (Moncada et al., 1991).

Outro inibidor da NOS que merece ser diferenciado é a aminoguanidina por possuir uma seletividade pela NOSi (Misko et al., 1993; Wolff & Lubeskie, 1993; Matson et al., 1998). Esse composto possui um coeficiente de inibição para a isoenzima induzida 32 a 52 vezes inferior aos obtidos para produzir alterações pressóricas agudas em ratos (Corbett et al., 1992). Um resumo dos principais inibidores da seletividade relativa e estrutura química primária é demonstrada na tabela 1.

Mais recentemente foi possível avaliar melhor a função das isoformas nos organismos graças ao desenvolvimento de animais destituídos geneticamente dessas enzimas. Já foram desenvolvidos animais transgênicos (knock-out) para as três isoenzimas (Sheseley et al., 1996; Huang et al., 1995; Laubach et al., 1995).

Tabela 1. Principais inibidores das isoenzimas sintetases de óxido nítrico

Composto	Abreviação	Estrutura Química	Potência Inibitória	Fonte
N ^ω -monometil-L-arginina			NOS _e =NOS _n > NOS _i	Endógena* e Síntese Artificial
N ^ω -nitro-Larginina			NOS _n =NOS _e >> NOS _i	Síntese Artificial
N ^ω -nitro-L-arginina metil éster			** NOS _e > NOS _n = NOS _i	Síntese Artificial
N ^ω -amino-L-arginina			NOS _n =NOS _e > NOS _i	Síntese Artificial
	7-NI		*** NOS _n >> NOS _e = iNOS	Síntese Artificial
N-δ-iminoetil-L-ornitina			NOS _i > NOS _e = NOS _n	Síntese Artificial
	PIN		NOS _i > NOS _e = NOS _n	Síntese Artificial
Peptídeo Inibidor Neuronal			Específico para NOS _n	Endógena
N ^ω -N ^ω -dimetil-L-arginina	L-ADMA		NOS _e >> NOS _n > NOS _i	Endógena*
N ^ω -N ^{ω'} -dimetil-L-arginina	L-SDMA		NOS _e >> NOS _n > NOS _i	Endógena*

* Produzida por vários tecidos, incluindo endotélio e encontrada no plasma e urina de seres humanos (Kakimoto e Akazawa, 1970; Vallance et al., 1992; Fickling et al., 1993; Kimoto et al., 1995).

** *In vivo* após hidrólise o L-NAME tem maior especificidade pela isoforma endotelial.

*** *In vivo* o 7-NI é captado seletivamente por neurônios, *in vitro* a potência de inibição é semelhante para as três isoformas.

1.5 O Papel do NO na Reprodução

Atualmente, sabe-se que o NO é produzido em diferentes células, incluindo células musculares, mesangiais, neurônios, plaquetas, hepatócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. O NO regula o tônus das células musculares, a agregação e adesão plaquetárias, o crescimento celular, a apoptose, a neurotransmissão, lesão celular, bem como as respostas imunes induzidas por infecções. Devido ao fato desses processos estarem associados à biologia, fisiologia e fisiopatologia de diversos processos reprodutivos é provável, que o NO desempenhe papel importante na reprodução. Na última década, o NO foi reconhecido como molécula reguladora importante da biologia e fisiologia do sistema reprodutivo (Rosselli et al, 1998).(Figura 3).

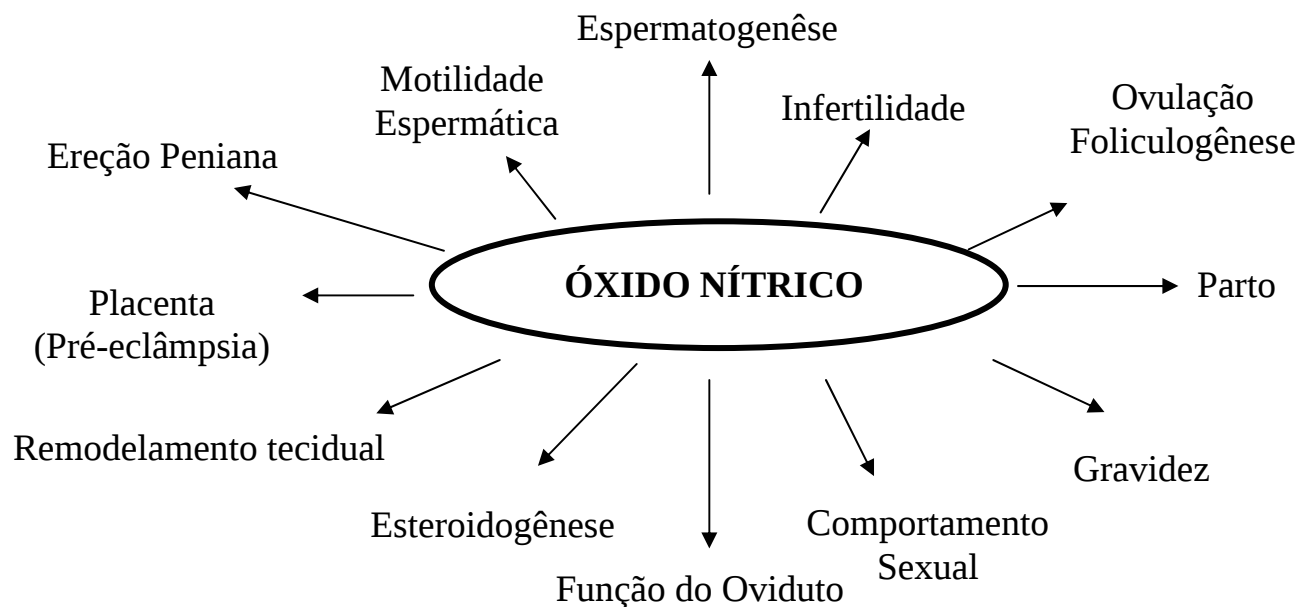


Figura 3. Papel do óxido nítrico na fisiologia do trato reprodutivo masculino e feminino. Adaptado de Rosselli et al, 1998.

1.6 O Papel do NO na Reprodução Feminina

1.6.1 Função Ovariana

O papel do NO como regulador da função ovariana foi evidenciado a partir da observação de que a síntese de NO aumenta com o desenvolvimento folicular. Durante o desenvolvimento folicular e a ovulação, foi observado a correlação do aumento dos níveis de NO e estrógeno (Rosselli et al, 1994a).

Shukovski & Tsafiriri (1994) demonstraram, que a administração intraperitoneal ou via região peri-ovariana de inibidores da óxido nítrico sintetase (NOS), inibiu a ovulação em ratas, fornecendo evidências de que o NO participa do processo ovulatório.

Bonello et al. (1996), constataram através de avaliação da interferência no fluxo sanguíneo para o ovário, que o NO participante do processo ovulatório não seja de origem endotelial, mas gerado localmente por células ovarianas bem como pela vasculatura ovariana, regulando a ovulação.

1.6.2 Função do Oviduto

A contração induzida por endotelina no oviduto teve sua intensidade diminuída pela administração de L-NAME, um inibidor da NOS evidenciando a participação do NO na fisiologia e regulação da função do oviduto (Rosselli et al., 1994b). Em 1997, Ekerhovd et al., constataram a ação do NO como mediador da atividade contrátil em anéis isolados de trompa de Fallopio humana.

O oviduto tem papel funcional crítico, sendo o local de fertilização e princípio do desenvolvimento embrionário. É possível que o NO tenha importante participação nesses processos. A liberação basal de NO pode promover a motilidade espermática e proteger o óvulo, bem como o espermatozóide dos danos causados pela ação dos radicais livres (Rosselli et al., 1994b).

Contrário a situação fisiológica, a NOS no oviduto pode aumentar sobre certas condições patológicas, como infecções ou endometrioses, que eventualmente levam a diminuição da fertilidade através do efeito deletério e/ou tóxico no espermatozóide, bem como no óvulo (Rosselli et al., 1998).

1.6.3 Função Uterina e Vaginal

O NO regula a contratilidade das células musculares lisas e a contração espontânea, bem como a distensão do útero durante a gravidez, tendo portanto ação reguladora de processos biológicos e fisiopatológicos do útero, tornando-se alvo de intensas investigações (Azuma et al., 1995; Dong & Yallamplalli, 1996).

Os vasos e neurônios uterinos expressam NOS, a qual modula, através do NO, o efeito contrátil de múltiplos fatores vasoativos locais e sistêmicos (Magness et al., 1996; Veille et al., 1996). Além de ter sido demonstrada a presença de NOS na parede dos vasos e neurônios, a presença desta sintetase foi encontrada no epitélio glandular, em células do estroma endometrial, células musculares lisas e mastócitos miometriais, sugerindo que o NO tem papel local

importante no controle geral da função uterina (Telfer et al., 1995).

Buhimschi et al. (1996), demonstraram que a cérvix de ratas expressa as três isoformas de NOS, a NOS induzida (NOSi), a neural (NOSn) e a endotelial (NOSc). Além disso, constataram que durante a gestação e no pré-parto os níveis de NOSi aumentam na cérvix e diminuem no útero. Com a administração de L-NAME, um inibidor da NOS, esses autores observaram um prolongamento do trabalho de parto.

Durante a gestação e o parto ocorrem mudanças hormonais e de seus receptores, que podem regular a atividade da NOS cervical. Ali et al (1997), evidenciaram que modificações da atividade da NOS cervical e uterina era progesterona dependente.

A atividade de NOS foi demonstrada na vagina. Charterjee et al (1996), encontraram NOSc ativa no tecido epitelial escamoso e nas células musculares lisas da vagina. A maior atividade dessa NOS foi demonstrada no estro e no pró-estro.

1.7 O Papel do NO na Reprodução Masculina

1.7.1 Óxido Nítrico e Regulação da Ereção Peniana

Em 1990, Ignarro et al. demonstraram pela primeira vez, que a estimulação elétrica de tiras isoladas de corpo cavernoso de coelho, promovia a formação endógena de NO. Baseado nestas observações, eles postularam que a ereção peniana é mediada pelo NO gerado em resposta a neurotransmissão não-adrenérgica-não-colinérgica (NANC). Subsequentemente, Holmquist et al (1991), forneceram evidências, que in vivo, a ativação da via arginina/NO induz ereção peniana em coelhos.

Após esses achados, a regulação endógena do NO e o mecanismo pelo qual ele regula a ereção peniana foi motivo de intensas investigações. Burnett et al (1992), localizaram atividade de NOS em neurônios penianos de ratos inervando o corpo cavernoso e plexo neural na camada adventícia de artérias peniana, sugerindo que o NO é mediador da função peniana (Figura 4).

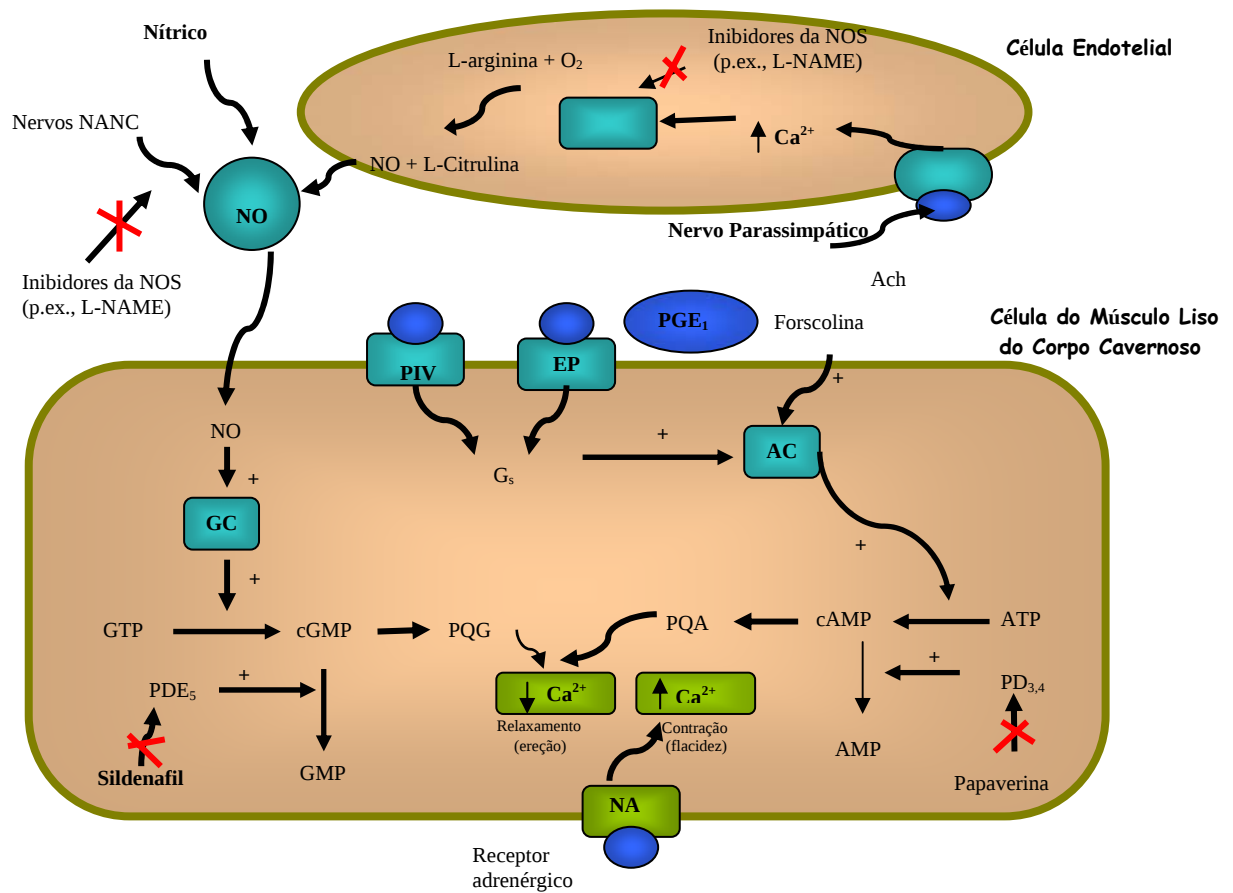


Figura 4. Mecanismos de regulação do tônus da musculatura lisa do corpo cavernoso e ereção peniana e modulação farmacológica. PGE₁= prostaglandina E₁; PIV= peptídeo intestinal vasoativo; PDE= fosfodiesterases; PQG e PQA= proteína quinase G e proteína quinase A. Adaptado de Bivalacqua et al., 2000.

Em 1992, Burnett et al., constataram a abundante presença de NOSc no endotélio da vasculatura peniana e no endotélio sinusoidal do corpo cavernoso. Morande et al. (1995), demonstraram atividade de NOS em células pineal.

Através de técnicas de imunohistoquímica e histoquímica Burnett et al. (1995), demonstraram a localização da NOS no trato genital de ratos machos. Estes autores demonstraram uma maior densidade da enzima na cauda do epidídimo e no canal deferente e uma menor densidade desta nos testículos, cabeça e corpo do epidídimo, vesícula seminal e glândula coagulatória. A medida da atividade enzimática da NOS através da análise da taxa de converção da L-arginina [H^3] em L-citrulina [H^3] e NO revelou, que os padrões funcionais são coerentes com a distribuição da NOS ao longo do trato genital. As maiores taxas de atividade enzimática sendo localizadas, portanto, na cauda epididimária e no canal deferente.

A NOS neuronal parece ter papel decisivo como mediador da ereção peniana (Burnett et al, 1996). Em humanos, a atividade NOS foi localizada de forma discreta em neurônios do plexo pélvico, em nervos do corpo cavernoso, incluindo as terminações de tecido erétil do corpo cavernoso, feixes neurais do dorso do pênis e plexos neurais da adventícia de artérias do corpo cavernoso (Burnett et al, 1993).

Em humanos, a atividade NOS foi identificada em discretos locais neuronais, incluindo plexo pélvico, nervos cavernosos e suas terminações, que se encontram dentro do tecido erétil, ramos do nervo dorsal peniano e nervo na

adventícia das artérias profundas (Burnett et al., 1993).

Foi demonstrado, que o neurônio pré-ganglionar que se estende da coluna vertebral ao pênis contem NOS (Vanhatalo & Soinila, 1995). Esses achados sugerem, que o NO afeta a ereção peniana em vários níveis neuronais (Vanhatalo et al., 1996). Adicionalmente, a injeção direta do L-NAME no núcleo paraventricular, mas não no núcleo caudal, no septo medial, área pré-óptica e a área CA1 do hipocampo inibe a ereção peniana induzida por apomorfina e ocitocina. Esses achados sugerem que ações do NO no cérebro e distal dos nervos periféricos, podem influenciar a ereção peniana (Melis et al., 1994a).

Em camundongos desprovidos de NOS_n, a NOS_c tem-se mostrado mediadora da ereção peniana dependente de NO (Burnett et al., 1996). Juntos, esses achados sugerem, que tanto a NOS_n como a NOS_c são capazes de regular a ereção peniana. Como o NO age como mediador da ereção peniana, fatores reguladores da NOS_n ou NOS_c podem diferencialmente interferir na ereção peniana (Rosselli et al., 1998).

A NOS neuronal do corpo cavernoso do pênis do rato foi clonado por Magee et al. (1996). O NOS_c presente no pênis difere do NOS_n cerebral pela presença de 102 nucleotídeos. O RNAm é expresso no pênis uretra, próstata e músculo esquelético do rato, coexistindo com a NOS_n cerebelar no plexo pélvico e bexiga e é, também, detectável no cerebelo.

As características da NOS_n sugerem, que esta pode ser regulada diferentemente da NOS_n cerebelar. Em adição a NOS_c e NOS_n, a NOS_i é expressada nas células do músculo liso do corpo cavernoso do pênis

(Garban et al., 1997). Recentemente foi feita a clonagem da NOS_i peniana de ratos e de humanos e os estudos demonstraram vários aminoácidos diferentes, quando comparado a sua isoforma análoga no tecido não peniano (Garban et al., 1997).

Como a disfunção erétil está associada com a atividade reduzida de NOS_n e também a redução da complacência da célula muscular lisa peniana (Regazzi et al., 1996; Carrier et al., 1997), a clonagem dessa isoforma pode abrir o caminho para possível gerenciamento da disfunção da ereção peniana.

De fato, a indução local de NOS_i injetando-se uma mistura de indutores corrigiu a disfunção peniana observada em ratos senescentes (Garban et al., 1997).

Várias linhas de evidências sugerem, que a via NO-GMPc é responsável pela mediação da ereção peniana em resposta a administração do ácido N-metil-D-aspartico (Melis et al., 1994b), acetilcolina (Champion et al., 1997), ocitocina (Melis et al., 1994a), apomorfina (melis et al., 1994a), cocaína (Chan et al., 1996), andrógenos de maneira geral (Person et al., 1996), testosterona (Zvara et al., 1995), dehidrotestosterona (Lugg et al., 1995), estimulação elétrica (Holmquist et al., 1991) e dopamina (Melis et al., 1996).

Em contraste, a ereção peniana induzida pelo peptídeo intestinal vasoativo e adrenomoduladores não foi revertida pelo L-NAME, um inibidor da NO sintetase, sugerindo que uma via independente de NO também participa da ereção peniana (Hayashida et al., 1996; Champion et al., 1997).

Juntos, esses achados reafirmam a importância e possível uso de

ativadores e potenciadores da via arginina-NO-guanilato ciclase como agentes terapêuticos na disfunção erétil. Devido aos vastos efeitos locais do NO no pênis e como esta molécula é muito lábil e de meia vida curta, a aplicação farmacológica da substância ativa no órgão em questão, pode ser efetiva em altas concentrações sem causar efeitos colaterais. A linsidomina (SIN-1), um doador de NO, tem sido usado com sucesso para corrigir desordens de ereção peniana em homens (Stief et al., 1992).

A regulação da ereção peniana por andrógenos e pela pituitária e seu relacionamento com a atividade de NOS é de interesse fisiológico especial. A deficiência de andrógenos como a testosterona, tem sido desde muito tempo associada a impotência e disfunções da ereção peniana (Garban et al., 1995; Penson et al., 1996). De fato, a castração resulta em significativa diminuição da atividade NOS_c e NOS_c no pênis e reduz a ereção peniana induzida por estimulação elétrica em 70% (Lugg et al., 1996; Penson et al., 1996). A administração da droga antiandrogênica, flutamina, a ratos não castrados, reduziu a atividade das enzimas NOS_c e NOS_n e também, a ereção peniana. Em ratos castrados a resposta erétil foi abolida completamente, entretanto a atividade NOS não estava diminuída abaixo dos valores observados em ratos castrados.

A administração de estrógeno a ratos castrados, assim como a hipofisectomia ou tratamento com antagonistas de GnRH em ratos intactos diminuiu a resposta erétil em níveis abaixo dos valores de animais castrados controle. Além disso, em ratos hipofisectomizados a atividade NOS peniana encontra-se abaixo dos níveis encontrados em animais castrados. Estes dados

sugerem, que a ereção peniana em ratos é completamente dependente de andrógenos, provavelmente devido a sua ação na manutenção da atividade NOS (Penson et al., 1996).

A disfunção erétil ocorre em patologias como o diabetes tipo I e II, acompanhada de hipogonadismo, bem como uma diminuição significativa da quantidade e atividade de NOSn no pênis (Vernet et al., 1995; Rehman et al., 1997). É possível, que a administração de andrógenos ou doadores de NO a ratos diabéticos pode ser terapeuticamente importante para melhorar a atividade NOS e consequentemente a ereção peniana. A tensão de oxigênio é regulador da síntese de NO, e baixa pressão de oxigênio inibe a atividade NOS no corpo cavernoso (Kim et al., 1993). Da mesma forma, o tabagismo leva a uma considerável diminuição da atividade NOS, com diminuição da quantidade de NOSn, que não é refletida na redução da resposta a estímulos elétricos (Xia et al., 1997). Esse fato pode ser atribuído a uma síntese compensatória de NO por outras isoformas de NOS. Na verdade, a atividade NOSc em ratos expostos ao cigarro não foi afetada (Xia et al., 1997), foi demonstrado que a NOSc induziu ereção peniana em camundongos com deficiência de NOSn (Burnett et al., 1996). A função erétil encontra-se diminuída em ratos velhos e senescentes. Comparando-se a ratos jovens, houve uma diminuição da atividade de NOS, bem como de fibras musculares contendo NOS em ratos velhos (Garban et al., 1995; Carrier et al., 1997).

Embora o mecanismo erétil permaneça intacto com o avançar da idade em ratos, as respostas estimulatória central e periférica estão diminuídas e há

também, a redução do número de fibras contendo NOS, que podem contribuir para essas observações.

Portanto, o NO tem papel decisivo na regulação da ereção peniana e a aplicação local de doadores de NO bem como terapia gênica podem tornar-se alternativas clínicas no tratamento da disfunção erétil (Rosselli et al., 1998).

1.7.2 Óxido Nítrico e Função Testicular

Ehrem et al.(1994), demonstraram pela primeira vez, a presença de baixos níveis de atividade de NOSc no testículo e altos níveis nos outros órgãos do trato urogenital masculino (uretra, bexiga, canal deferente, próstata e vesícula seminal) (Figura 5).

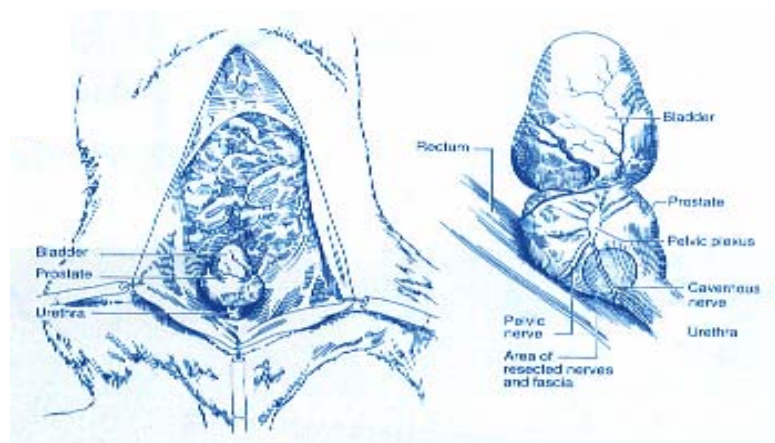


Figura 5. Anatomia do Trato Reprodutivo Masculino de Rato

O papel do NO no testículo foi evidenciado pelo fato desse órgão apresentar três categorias de enzimas importantes para a síntese do mesmo.

Milstien et al. (1996) constataram a presença da GTP-ciclohidrolase I, a enzima inicial para a síntese de THB₄. A argininosuccinato sintetase e liase, enzimas responsáveis pela geração de L-arginina, foram detectadas em abundância no testículo (Yu et al., 1995). Ewing & Maines (1995), confirmaram a existência da isoenzima heme oxigenase HO-1 e HO-2, que clivam a heme molécula para produzir NOS.

Para avaliar a relevância fisiológica da atividade de NOS no testículo, a distribuição da mesma foi caracterizada em várias células. Células de Leydig, de Sertoli e endoteliais de testículo humano, demonstraram possuir NOS_c ativa (Davidoff et al., 1995; Zini et al., 1996).

Em 1997, Davidoff et al. demonstraram a co-localização do GMP_c nas células de Leydig, o que sugere que as células testiculares são equipadas com a via NO-GMP_c, podendo participar de forma importante na regulação das funções testiculares como espermatogênese e esteroidogênese.

A NOS_c está presente nas células de Sertoli e Leydig em todos os estágios da espermatogênese, porém foi constatado que a NOS_c ativa está correlacionada a processos degenerativos e à apoptose celular (Zini et al., 1996).

O NO atua no testículo como um regulador do fluxo sanguíneo, da permeabilidade celular e na função contrátil das miofibrilas, regulando assim, a síntese e transporte de esteróides (Adams et al., 1994; Davidhoff et al., 1995). Wang et al (1997) identificaram uma variação testicular da NOS_n. O papel do NO como regulador da esteroidogênese no testículo e os fatores autócrino-parácrino na regulação desse processo tem sido alvo de constantes

investigação, sendo um dos objetivos de nosso trabalho.

1.7.3 Óxido Nítrico e Motilidade Espermática

O NO regula a motilidade espermática (Hellstrom et al., 1994). Em condições fisiológicas, pequenas quantidades de NO são geradas neutralizando radicais livres que inibem a motilidade espermática. Já em estados patológicos, a excessiva produção de NO contribui para a formação de peroxinitrito, um ânion altamente tóxico, que reduz a motilidade espermática (Rosselli et al., 1995).

Além do NO, a L-arginina, o substrato para a NOS influencia a viabilidade espermática. Em homens com anormalidades espermáticas, os níveis de arginina estavam mais baixos, quando comparados aos encontrados em indivíduos normais (Szabo et al., 1996).

1.7.4 Óxido Nítrico e Espermatogênese

A espermatogênese é um complexo processo de divisão e diferenciação celular que conduz a formação do espermatozóide (SPTZ) (McDonald & Pineda, 1989), enquanto mantém o número de espermatogônias (Courot et al, 1970; Ortavant et al, 1977). A liberação do SPTZ é um evento que culmina numa série de outros eventos, que tiveram início na vida fetal (Setchell, 1982).

As células espermáticas são oriundas a partir das células germinativas primordiais, que migram do saco vitelínico para a gônada indiferenciada, onde estas células, por um mecanismo de diferenciação que se inicia na puberdade, vão formar as espermatogônias e determinar a espermatogênese (Garner &

Hafez, 1982). Segundo Farris (1971), a origem da espermatogênese em ratos ocorre em torno de 50 a 60 dias de vida.

Para que ocorra a multiplicação e manutenção de uma numerosa quantidade de espermatogônias, nesse processo está envolvida uma série de divisões mitóticas de uma espermatogônia denominada Tipo A1, para células mais diferenciadas, denominadas A2, A3, In, B1 e B2 (Amann & Schanbacher, 1983).

A espermatogênese pode ser dividida em fases distintas, que são espermatocitogênese e espermiogênese. A espermatocitogênese é uma fase proliferativa, onde as células germinativas são multiplicadas por uma série de divisões mitóticas seguida de divisões meióticas, ou seja, de espermatogônia a espermatíde (McDonald & Pineda, 1989) (Figura 6).

A espermiogênese é uma fase diferenciativa, onde o núcleo e o citoplasma sofrem mudanças para formar o espermatozóide (McDonald & Pineda, 1989). Segundo Ortovant (1977), nesta fase, a espermatíde sofre uma metamorfose para se transformar, posteriormente, em espermatozóide.

O NO é um radical livre ativo e um importante mensageiro intracelular. Foram descritos efeitos de doadores de NO, como o nitroprussiato de sódio no espermatozóide. O nitroprussiato de sódio estimula a hiperativação e a síntese de prostaglandinas e de leucotrienos em espermatozóide de camundongos (Herrero et al. 1994; Herrero et al., 1995) e aumenta a motilidade e a peroxidação lipídica em espermatozoides humanos (Hellstrom et al., 1994).

Zamir et al. (1995), observaram que o nitroprussiato de sódio estimula

a formação de GMPc e a reação acrossômica em espermatozóides bovinos. Entretanto, Herrero et al. (1996), demonstraram que houve redução da fertilização *in vitro*, quando espermatozóides de camundongos foram incubados com L-NAME, sugerindo a participação do NO na fisiologia dos mesmos. Em 1997, Herrero et al., evidenciaram a presença de NOS em espermatozóides de camundongos e afirmaram, que os espermatozóides de mamíferos tem habilidade potencial para sintetizar NO, sugerindo um papel do NO endógeno na função espermática.

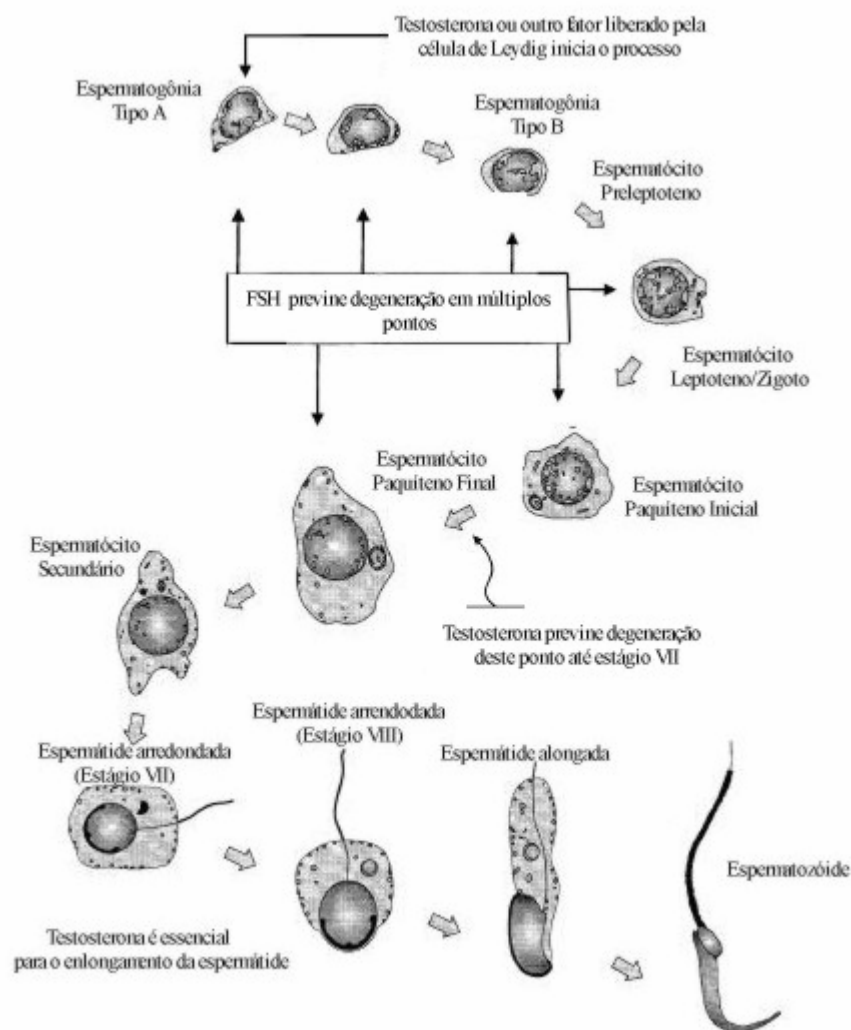


Figura 6- Espermatogênese no rato. Os efeitos da testosterona e FSH na progressão das células espermatogênicas são mostrados (setas) no esquema acima. O FSH age predominantemente para dar suporte à diferenciação das espermatogônias prevenindo a degeneração prematura das mesmas e das espermátides, além de promover a divisão meiótica dos espermatócitos na fase de paquíteno, dando origem a espermátides arredondadas. O principal efeito da testosterona é de facilitar a progressão de espermátides arredondadas (nos estágios VII-VIII do ciclo espermatogênico) em espermátides em alongamento, talvez mantendo a ligação física das células “attachment” às células de

1.7.5 Controle Hormonal da Espermatogênese

Segundo Austin (1983), o início da espermatogênese durante a puberdade requer tanto FSH como LH. A ação do LH é indireta, através da estimulação da produção de testosterona pelas células de Leydig, pois altos níveis de testosterona são requisitados para a espermatogênese.

O requerimento hormonal para iniciar a espermatogênese em animais imaturas difere do requerido para a manutenção da espermatogênese em animais hipofisectomizados (Kaltenbach & Dunn, 1987). Steinberger (1974), propôs que a mitose da espermatogônia e o estágio inicial da meiose são hormônio independente e que a redução final da meiose requer testosterona, enquanto que a diferenciação morfológica final de espermatíde em SPTZ requer FSH e talvez testosterona.

Segundo Reeves (1987), o LH e o FSH são liberados de forma tônica e basal. Os níveis tônicos são responsáveis pelo controle da liberação através do *feedback* (-) das gônadas.

1.7.6 Óxido Nítrico e Esteroidogênese

Rettori et al.(1994) demonstraram evidências diretas da participação do NO como regulador da síntese do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH). Em 1979, Ojeda et al. demonstraram, que a PGE₂ estimula a liberação de LHRH tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”. Rettori et al.(1992) evidenciaram a

participação do NO indutor da liberação e síntese de PGE₂ do hipotálamo. Estes fatos sugerem que o NO deve ativar enzimas como a cicloxigenase, responsável pela conversão de ácido araquidônico em prostanóides.

A norepinefrina é tida como indutor da liberação de LHRH via α_1 -adrenoreceptores. A síntese de LHRH induzida pela norepinefrina é acompanhada por aumento da concentração de PGE₂, porém o uso de inibidores da NOS (L-NAME) ou sequestradores de NO (p.ex., hemoglobina), bloqueiam o efeito da norepinefrina sobre a síntese de LHRH. Esses achados tornam evidente a participação da PGE₂, modulada positivamente pelo NO como mediadora da síntese de LHRH induzida por norepinefrina (Rettori et al., 1992; McCann & Rettori, 1996 a).

Outro agente promotor de liberação do LHRH do hipotálamo é o ácido glutâmico, que também induz liberação de norepinefrina no cérebro (Navarro et al., 1994). Inibidores da NOS como o L-NMMA bem como a hemoglobina (um sequestrador de NO) são inibidores da liberação de LHRH induzida pelo ácido glutâmico (Rettori et al., 1994).

O NO gerado a partir de neurônios geradores de NO induz a liberação de LHRH (Bonavera et al., 1993).

A ocitocina pode induzir comportamento de monta via liberação de LHRH induzida por NO (Rettori et al., 1997). Esses autores demonstraram que a ocitocina estimulou a liberação de LHRH, PGE₂ e NO quando da ausência de L-NMMA, enquanto que na presença deste inibidor de NOS a estimulação não ocorreu. Além desses achados esse grupo de pesquisadores constatou, que o

NO gerado a partir da estimulação pela ocitocina libera LHRH bem como inibe a liberação de ocitocina através de um *feedback* (-).

A liberação de LHRH é pulsátil e não constante. Estudos demonstraram a participação de ácido γ -aminobutírico (GABA) como regulador desse fenômeno. Inibidores da NOS como o L-NMMA e hemoglobina previnem o efeito inibitório do GABA, sugerindo que esse efeito seja mediado pelo NO (Rosselli et al., 1998).

A importância fisiológica desse processo é que o LHRH estimula a glândula pituitária com subsequente liberação de gonadotrofinas, que por sua vez ativam as gônadas para produzir os esteróides sexuais. Nas fêmeas, o LHRH induz ovulação e luteinização das células precursoras do corpo lúteo, enquanto que em machos induz a espermatogênese. Portanto, o LHRH age não somente na regulação gonadal, mas também na secreção de esteróides tanto em machos quanto em fêmeas (McCann, 1982; Jenner & Conn, 1994).

A atividade NOS tem sido demonstrada em células de Leydig e Sertoli do testículo (Davidoff et al., 1997). Essas células são importantes reguladoras da síntese de testosterona. Desta forma é provável que o NO também regule a síntese de testosterona.

Estudos evidenciaram, que o NO participa da síntese de testosterona como um regulador negativo da mesma (Adams et al., 1992; Welch et al., 1995).

Adams et al. (1993) demonstraram que a supressão de testosterona induzida pelo álcool foi revertida na presença de L-NAME, sugerindo que o etanol induz seu efeito via geração de NO. A administração de L-NAME

aumentou a concentração de testosterona plasmática em ratos, sugerindo que o NO é um regulador negativo da síntese de testosterona. Adams et al. (1996), demonstraram que o L-NAME aboliu a supressão induzida por morfina e a liberação da síntese de testosterona induzida por HCG, indicando que esse efeito ocorre diretamente no testículo e não é dependente da secreção de LH. Devido ao fato do NO e do L-NAME não aumentarem o efeito da morfina nem do naltrexone (um antagonista dos opióides), respectivamente, é possível que o NO e os opióides suprimam a liberação de testosterona por mecanismos diferentes.

Com o intuito de mostrar o mecanismo pelo qual o NO suprime a liberação de testosterona, Welch et al. (1995) demonstraram que a liberação da síntese de testosterona induzida por HCG em cultura de células de Leydig aumentou nos tratamentos com L-NMMA e L-NAME e esse aumento foi acompanhado pela diminuição intracelular de GMPC. Esses achados sugerem que o NO medeia seus efeitos via GMPC.

A administração *in vivo* de vasodilatadores como a hidralazina e nicardipina (não geradores de NO), inibiram a liberação basal de testosterona, bem como a liberação induzida por L-NAME, sugerindo um envolvimento vascular, porém de forma especulativa (Adams et al., 1994).

A esteroidogênese nas células de Leydig é controlada por hormônios do eixo hipotalâmico hipofisário, bem como por diversos outros fatores produzidos no testículo que atuam de modo autócrino e/ou parácrino (Saez, 1994). Investigações recentes focam fatores central e periférico como mediadores da ação inibitória na produção de andrógeno e na função celular controlada

por andrógeno. Exemplo disso, os peptídios opióides endógenos são importantes moléculas mensageiras envolvidas no controle parácrino da função testicular, especialmente nas mudanças na esteroidogênese testicular (Akinbami et al., 1994; Kostic et al., 1997). Kostic et al. (1998), indicaram um possível papel do NO com regulador decrescente da produção de andrógenos. Entretanto, não está claro o que esse achado representa para a ativação da via do NO testicular. Esses autores concluíram, que há controvérsias sobre a ação direta do NO sobre as células de Leydig, ou se haveria uma ação indireta através da produção local de outras moléculas sinalizadoras.

1.7.7 Óxido Nítrico e Comportamento Sexual

Estímulos sexualmente relevantes elicitam uma complexa cascata de parâmetros genital e somatomotor, que são facilitados por hormônios esteróides. Uma grande quantidade de evidências experimentais, principalmente conduzidas em ratos de laboratório, demonstraram que o comportamento sexual masculino está sob controle de neurotransmissores específicos (Larsson & Ahlenius, 1999).

Um dos agentes que desempenham papel central neste processo é a dopamina (DA), tendo em vista que as drogas dopaminérgicas desde muito tempo são sabidamente facilitadoras do comportamento sexual masculino (Bitran & Hull, 1987; Melis & Argiolas, 1994). O estímulo proveniente de uma fêmea receptiva leva à liberação de dopamina em pelo menos três sistemas integrados. Atividade somatomotora promovida pelo sistema nigroestriatal;

numerosos tipos de motivação provenientes do sistema mesolímbico; e a

área pré-óptica medial (MPOA) apontam para a motivação especificamente em direção a alvos sexuais, aumentando a eficiência e taxa copulatória e coordenando os reflexos genitais. A presença prévia de testosterona é permissiva para liberação de DA na MPOA, tanto em condições basais quanto em resposta a fêmea. Uma das maneiras pelas quais a testosterona pode aumentar a liberação de DA é através da regulação crescente de NOS, o que por sua vez aumenta a liberação de DA. Além disso, a liberação de LH, esteróide dependente, tanto em ratos machos como fêmeas é dependente de receptores de glutamato do tipo NMDA, de NO e de GPMc (Pu et al., 1996).

Micro-injeções de uma alta dose de inibidor de NOS na MPOA inibiu a habilidade dos machos de copularem (Moses, 1999). A aplicação de diálise reversa de L-arginina na MPOA aumentou a taxa de cobertura, enquanto a diálise reversa de inibidores da síntese do NO diminuíram a taxa de monta (Sato et al., 1998). Portanto, o NO é um importante mediador de liberação de DA na MPOA tanto em condições basais como em situações sexuais e isto pode facilitar a copulação.

Hull et al.(1994), demonstraram que o pré-tratamento com L-NAME diminuiu o número de intromissões e ejaculações, além de inibir os reflexos copulatórios não relacionados á cópula (ex-cópula), tais como antero reflexo do pênis e ereção. No entanto, estes autores observaram haver um aumento da emissão seminal, o qual foi relacionado a uma estimulação nervosa simpática. Isto se deve ao fato do NO manter um tônus inibitório basal em muitas funções simpáticas (Lewis et al., 1991); Benson et al., 1988; Harada et al., 1993;

Togashi et al., 1992; Iadecola et al., 1993).

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

- Avaliar a participação do óxido nítrico nos eventos reprodutivos de ratos machos.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito da inibição crônica da óxido nítrico sintetase, com a finalidade de avaliar a participação do óxido nítrico sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, descida testicular e esteróidogênese.
- Avaliar os efeitos da inibição crônica da óxido nítrico sintetase (NOS) sobre a morfologia espermática, fertilidade e comportamento sexual de ratos machos.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.1 - Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) imaturos, com idade de 20 dias e ratos Wistar adultos de ambos os sexos, com variação de peso para machos de 200 a 300g e para fêmeas de 150 a 180g, provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em ciclo de 12/12 horas de claridade/escuridão, recebendo água e ração padrão (Purina) *ad libitum*.

3.1.2 – Drogas e Reagentes

- Acetato de uranila a 2% (Merck, Alemanha)
- Ácido periódico de Schiff (Merck, Alemanha)
- Álcool etílico – etanol (Reagen)
- Cadmium (Sigma, EUA)
- Eosina (Merck, Alemanha)
- Epon 812 (Sigma, EUA)
- 17 β -estradiol (Sigma, EUA)
- Éter etílico (Reagen)
- Formol 10% (LabSynth, Brasil)
- Glutaraldeído a 2,5% (Merck, Alemanha)
- Hematoxilina (Merck, Alemanha)
- Kit para dosagem de testosterona (DPC, EUA)
- L-arginina (Sigma, EUA)
- L-nitro- arginina metil éster (Sigma, EUA)
- L-nitro-arginina (Sigma, EUA)

- Nitroprussiato de sódio (Sigma, EUA)
- Óleo mineral
- Papanicolaou (Reagen)
- Parafina
- Pilocarpina (Sigma, EUA)
- Solução fisiológica (NaCL 0.9%)
- Sulfato de atropina (Sigma, EUA)
- Tampão cacodilato 0,1M pH 7,2
- Tampão de Cloreto de amônia 75mM, pH 9,6
- Tampão fosfato 0,2M pH 7,2

3.1.3 - Aparelhos e Materiais

- Aparelho de radioimunoensaio, Gamma C12 (DPC, EUA)
- Autoclave (Fabbe-103)
- Balança Analítica (Marte AL-200)
- Balança para pesagem de animais (Filizola ID-1500)
- Caixas para animais de laboratório 25x25x20 cm e 40x40x20 cm
- Câmara hematimétrica (Câmara de Neubauer) (Wschreck Hofheim, Alemanha)
- Capilares venosos de vidro (Perfecta)
- Centrífuga (Faben-215)
- Cronômetros (Technos Quartz-965)
- Espectrofotômetro (Beckman DU 640B)
- Estantes para Tubos de Ensaio (Interlab)
- Fios de sutura seda 4-0 (Brasmedica)
- Fisiógrafo Narco DMP4 (Bio-System, EUA)
- Transdutor Stathon, P23.
- Freezer -75°C
- Freezer Doméstico (Brastemp FF-260)
 - Lâminas e lamínulas (Interlab)

- Material fotográfico para microscopia eletrônica (Kodak, Alemanha)
- Medidor de pH (Analion PM-608)
- Microscópio eletrônico Modelo10 (Carl Zeiss, Alemanha)
- Microscópio óptico acoplado a câmara fotográfica, modelo Nikon10 (Nikon, Japão)
- Pipeta para contagem de leucócitos (Interlab)
- Ponteiras plásticas 200 e 1000µl (Oxford)
- Seringas de volumes variados (Unaplic)
- Sondas de polietileno PE50 e PE70 (Brasmedica)
- Tubos de ensaio (Interlab)

3.2 – Métodos

3.2.1 - Descida Testicular

No intuito de verificar a participação do NO na descida testicular, o efeito de um inibidor da NOS foi avaliado sobre a duração do período da descida dos testículos em ratos imaturos.

Ratos machos Wistar imaturos (20 dias de vida) foram divididos em 03 grupos de 12 animais e tratados com veículo (salina 0,9%, 10ml/kg/dia, v.o), L-NAME (20 mg/kg v.o.) ou L-NAME (20mg/kg v.o) + L-arginina (600mg/kg i.p.), duas vezes ao dia, por um período de 10 dias.

Durante o tratamento foram feitas observações diárias da descida testicular, onde o parâmetro adotado para a confirmação da descida testicular completa, consistiu da observação da presença dos dois testículos na bolsa escrotal.

3.2.2 - Emissão Seminal Induzida pela Pilocarpina

Drogas colinérgicas como a pilocarpina têm demonstrado induzir a

resposta de emissão seminal, porém os mecanismos não são claros. Um possível papel do NO foi investigado utilizando-se um inibidor de NOS na emissão seminal induzida por pilocarpina.

Ratos Wistar pesando entre 200 e 300g foram mantidos individualmente em caixas de metal (25 x 25 x 30 cm) e com um espelho obliquamente posicionado, que permitiu a observação do processo de emissão seminal. A escolha dos animais foi feita de forma aleatória e os experimentos foram conduzidos entre as 9:00 e 14:00 horas. Cada animal foi utilizado somente uma vez e colado para ambientação na caixa de metal por um período de 30 minutos antes da aplicação das drogas. A emissão seminal na forma de gotas foi contada através de observação direta durante um período de 60 minutos subsequentes a aplicação da pilocarpina e quando necessário utilizou-se o microscópio óptico para confirmação do exame. Nossos experimentos preliminares mostraram, que a maioria das emissões ocorreram entre o período de 15 a 45 minutos após estimulação com a pilocarpina. As drogas utilizadas nos pré-tratamentos foram administradas 15 minutos antes da aplicação da pilocarpina. Os resultados foram expressos em gotas de sêmen durante o período de 60 minutos.

Foram constituídos grupos tratados com pilocarpina (0,75, 1,5 e 3,0 mg/kg, i.p.) para avaliação de dose resposta desta droga na emissão seminal, onde observou-se o melhor resultado na dose de 3 mg/kg de pilocarpina. Posteriormente, animais foram pré-tratados com atropina na dose de 5 e 10mg/kg, s.c., seguido de tratamento com pilocarpina (3mg/kg, i.p.). Um outro tratamento foi feito utilizando-se o L-NAME nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg,s.c., 15 minutos antes da administração da pilocarpina (3mg/kg, i.p.). Foram criados grupos experimentais para avaliar os efeitos da co-administração de L-arginina (600mg/kg, s.c.) ou nitroprussiato de sódio (0,5mg/kg, s.c.) com L-NAME (5mg/kg, s.c.) na resposta da emissão seminal induzida por pilocarpina (3mg/kg, i.p.).

3.2.2.1 – Dosagem de Nitrito/Nitrato

Amostras de urina dos grupos experimentais citados no item 3.2.2 foram coletadas por meio de estimulação manual e colocadas em tubos resfriados em gelo durante o período da coleta, que levou de 30 a 60 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 800g por 10 minutos.

As amostras foram congeladas a -75°C até serem analisadas. Os níveis urinários de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ foram medidos após redução do NO_3^- para NO_2^- pelo cádmio e as amostras analisadas com base na reação de Greiss (GREISS & BEMERKUNGEN, 1879). Em síntese, 1ml de urina (1:10, v/v) centrifugada foi adicionada a 0,25ml de tampão cloreto de amônia (75mM, pH 9,6). Esta solução foi introduzida numa seringa especial de 3ml contendo 1g de cádmio em pó pré-tratado com 3ml de 0.1N HCl e 3ml de cloreto de amônia (75mM, pH 9,6). Depois de 5 minutos, sendo feita agitação constante, para viabilizar a redução do NO_3^- para NO_2^- pela ação do cádmio, a amostra foi ejetada da seringa e analisada em seu conteúdo de nitrito pela reação de Greiss em 540 nm. A curva padrão foi construída tanto para NO_3^- aspirado da seringa com cádmio, quanto para NO_2^- utilizando nitrato e nitrito de sódio, respectivamente. Em ambos os experimentos, obteve-se 100% de redução de NO_3^- para NO_2^- até a concentração de 10mM de NO_3^- . Os resultados foram expressos em $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (μM).

3.2.3 – Inibição Crônica da Óxido Nítrico Sintetase (NOS)

O objetivo maior desse estudo foi estabelecer o papel do NO no comportamento sexual, na função testicular e na fertilidade de ratos machos. Ratos machos Wistar (200 - 300g) de fertilidade comprovada, foram divididos em grupos de 06 animais, e tratados com veículo (salina 0.9%, 10ml/kg/dia, v.o.) ou N^{ω} -nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME, 40mg/kg/dia, v.o.) por um período de 56 dias, equivalente a duração do ciclo espermato gênico em ratos. Após 56 dias de tratamento, 06 animais de cada grupo foram submetidos a testes de

comportamento sexual, utilizando-se fêmeas ooforectomizadas, sendo posteriormente sacrificados para coleta de testículos e epidídimos, que foram utilizados para análise de morfologia espermática, avaliação do quadro histológico e processados para análise em microscopia eletrônica. Os animais restantes foram submetidos a teste de fertilidade acasalados com fêmeas de fertilidade comprovada.

3.2.3.1 – Medição da Pressão Arterial

Com o intuito de avaliar a eficiência dos inibidores da NOS, ao final dos tratamentos foram feitas medições de pressão arterial. Para tal, um total de 12 animais (06 animais do grupo controle e 06 do grupo tratado), foram anestesiados com uretano numa combinação da via peritoneal (300mg/kg) e endovenosa (700mg/kg).

Após a anestesia, os tecidos subcutâneo e muscular foram divulsionados e a artéria carótida comum esquerda dissecada e canulada com cânula de polietileno. Os mesmos procedimentos foram realizados para canular a veia jugular esquerda.

Após a preparação cirúrgica, os animais foram imediatamente instalados no sistema composto de fisiógrafo acoplado a um transdutor de pressão, conectado à cânula arterial e a uma bomba de infusão contínua, sendo esta, conectada à cânula jugular. Tão logo o animal fora instalado no sistema, inclinava-se o registro da pressão arterial (PA controle), até que esse se estabilizasse, o que transcorria em torno de 15-20 minutos. A partir daí o fisiógrafo registrou os dados de pressão arterial durante 15 minutos. A pressão arterial média foi calculada tomando-se como base a equação:

$$PAM = \frac{PS + 2PD}{3}$$

3.2.3.2 – Comportamento Sexual

Os grupos de animais citados no item 3.2.3, ao final dos tratamentos, foram submetidos a avaliação quanto ao efeito da inibição crônica da NOS no comportamento sexual, utilizando-se grupos de 10 fêmeas Wistar adultas (150-180g) ooforectomizadas. Dez dias após o procedimento cirúrgico as fêmeas foram tratados com 17β -estradiol (20 μ g/kg s.c.) e progesterona, administrada em duas doses, sendo a primeira 72 e a segunda 8 horas antes de serem colocadas com os machos em teste na proporção de 1:1 (macho/fêmea).

A latência e frequência de monta e intromissão foram avaliadas através de observação visual. A ocorrência de monta foi considerada, quando os machos apresentavam comportamento de cortejo às fêmeas, que caracterizou-se por perseguição, seguida da monta propriamente dita e agarramento na região do flanco e demonstração de rápidos e sucessivos movimentos de cópula.

A intromissão foi possível de ser diferenciada da monta pelo movimento característico de cópula mais acentuado e demorado, onde à desmonta pôde-se observar, que no caso de ter havido ejaculação os machos apresentaram um comportamento de inatividade por um período de 5-10 minutos.

Para confirmar a ocorrência da ejaculação realizaram-se lavados vaginais para detectar a presença dos espermatozóides, além de observar-se a presença do tampão mucoso na região vulvar das fêmeas. Os animais foram observados por um período de 30 minutos.

3.2.3.2.1 - Ooforectomia

Dez fêmeas foram submetidas a um regime de dieta zero, com livre acesso a água nas 12 horas antecedentes a cirurgia. Os animais foram anestesiados em câmara de vidro com éter, sendo em seguida imobilizados e colocadas em decúbito ventral.

O ato cirúrgico consistiu em uma única incisão na região abdominal, mais precisamente 0,1cm abaixo do umbigo, com uma extensão de

aproximadamente 1,0 a 1,5cm. A retirada dos ovários foi viabilizada através de um corte próximo a porção distal dos cornos uterinos. O seguimento uterino cortado, foi suturado com fio “cat-gut” e a pele, posteriormente suturada com fio de algodão. Dez dias após a cirurgia os animais encontravam-se aptos a serem utilizados no experimento.

3.2.3.3 - Fertilidade

O segundo grupo de animais citados no item 3.2.3, foram submetidos a teste de fertilidade. Esse parâmetro foi avaliado através da colocação dos referidos machos com fêmeas de fertilidade comprovada, apresentando ciclos estrais regulares, onde após detecção do estágio de pró-estro as mesmas eram colocadas junto aos machos na proporção de 1:1 (macho/fêmea), durante toda a noite.

Na manhã do dia seguinte, foram realizados lavados vaginais e quando da presença de espermatozóides, considerou-se a partir daí o primeiro dia da gestação. No vigésimo dia da gestação as fêmeas foram sacrificadas em câmara com éter, realizando-se então, a contagem, medição e pesagem dos fetos, além da contagem das reabsorções e de fetos com teratogênese.

3.2.3.4 – Pesos Corporais e Pesos Relativo dos Órgãos

Dos grupos de animais citados no item 3.2.3, submetido ao sacrifício para retirada de testículos e epidídimos, foram coletados também as próstatas e vesículas seminais. Esses animais tiveram aferição de seus pesos corporais no início e ao final do tratamento. Tomando-se como referência o peso corporal final, foram feitas aferições dos pesos relativos do epidídimo, da próstata e da vesícula seminal.

3.2.3.5 – Histologia Testicular

3.2.3.5.1 - Microscopia Óptica

Após realização dos testes de comportamento e fertilidade, os animais foram sacrificados e os testículos imediatamente retirados e pesados sendo um deles fixado em formaldeído a 10% e o outro, reservado para a avaliação em microscopia eletrônica. Fragmentos deste órgão foram incluídos em parafina e feitos cortes de 5µm de espessura corados pela hematoxilina-eosina (HE) para análise histológica.

Mudanças histológicas associadas ao tratamento com L-NAME tiveram como parâmetros a integridade da estrutura do tecido, tamanho do lúmen dos túbulos seminíferos, aspecto do epitélio e presença ou ausência dos estágios da espermatogênese.

A mensuração do diâmetro e área dos túbulos seminíferos foi feita utilizando-se uma lâmina micrométrica 1/0.01 (Carl Zeiss) e a ocular do tipo Kellner x 10 (Nikon). Um número mínimo de 10 túbulos foi aleatoriamente selecionado para determinar a média de diâmetro de cada fragmento analisado.

Para a avaliação do efeito do tratamento sobre as células da linhagem espermatogênica, procedeu-se a contagem das espermatogônias e espermátides em 50 túbulos entre os estágios VI a VIII do ciclo espermatogênico, segundo a classificação de Leblond & Clermont (1952).

3.2.3.5.2 - Microscopia Eletrônica

Após sacrifício e retirada dos testículos, com auxílio de bisturi, foram cortados pequenos fragmentos e fixados em glutaraldeído a 2,5% e fosfato tamponado (pH 7,4) a temperatura de 40°C. Em seguida os fragmentos foram recortados em blocos de 1mm³ e submetidos a sucessivas lavagens com tampão fosfato (3 lavagens, 10 minutos cada) e deixados no mesmo durante a noite. Após a retirada do fixador, os fragmentos foram submetidos a tratamento pelo

ósio (após-fixação), em solução de tetróxido de ósio a 1% e tampão fosfato a 0,1M (pH 7,3) por duas horas a 4°C. O material foi em seguida desidratado em concentrações crescentes de acetona e incluído em Epon. Foram então realizados cortes de 0,6µm com navalha de diamante em ultra-micrótomo, montados em grades de 200 “Mesh”, duplamente corados com acetato de uranila e citrato de chumbo, examinados e fotografados em microscópio eletrônico (Carl Zeiss, modelo 10).

Foi avaliada, qualitativamente, a morfologia das espermatogônias, células de Sertoli, de Leydig e demais células da linhagem espermatogênética. Os parâmetros para avaliação constaram da observação da morfologia e integridade da membrana plasmática, do núcleo, de estruturas juncionais, de desmossomas e de organelas citoplasmáticas.

3.2.3.5.3 – Morfologia e Concentração Espermática

Os epidídimos foram removidos e a porção caudal, pesada e cortada em pequenos fragmentos com lâmina de bisturi, sendo em seguida homogeneizada em 20ml de salina 0,9%. Deste homogeneizado retirou-se uma gota e procedeu-se ao esfregaço sobre lâmina de vidro. O material foi posto para secagem em meio ambiente, fixado em formol tamponado a 10% e corado pela técnica de Papanicolau.

As anormalidades espermáticas foram avaliadas através de microscopia óptica, quanto a morfologia de cabeça e cauda dos espermatozóides. Dentre as patologias de cabeça foi considerada a ocorrência de cabeças isoladas, estreita na base e as que não possuíam a forma de gancho. Quanto as patologias de cauda, foi considerada a ocorrência de caudas dobradas, enroladas e fragmentadas. Para a avaliação foram contados 200 espermatozóides.

O restante do homogeneizado epididimário foi diluído na proporção de 1:20, utilizando-se uma pipeta para contagem de leucócitos. A concentração espermática foi avaliada em câmara hemocitométrica de Neubauer e os resultados expressos em $10^4/\text{mm}^3$.

3.2.3.6 - Dosagem de Testosterona Plasmática

Amostras de sangue dos grupos controle e tratado foram coletadas através da compressão do plexo vascular do globo ocular, utilizando-se tubos de microhematócrito não heparinizados. Após a coleta as amostras foram centrifugadas para obtenção do plasma e submetidas a avaliação quanto a concentração de testosterona por radioimunoensaio.

3.2.3.7 – Análise Estatística

Os dados foram expressados em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e analisados através de análise de variância ou alternativamente pelo teste de Kruskal-Wallis , sempre que os dados não alcançavam uma distribuição normal. As diferenças entre grupos foram testadas pelos testes t-Sudent ou através do teste Mann-Whitney. As proporções foram analisadas através do teste de Qui-quadrado ou alternativamente pelo teste de Fischer. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$).

4 - RESULTADOS

4.1 - Descida Testicular

O grupo tratado com o L-NAME (20mg/kg/dia, v.o.) apresentou um retardamento altamente significativo no processo de descida testicular, quando comparado ao grupo controle. Quando utilizamos a associação de L-NAME (20mg/kg/dia, v.o.) + L-arginina (600mg/kg/dia, i.p.), houve uma reversão ao nível do controle (Figura 7).

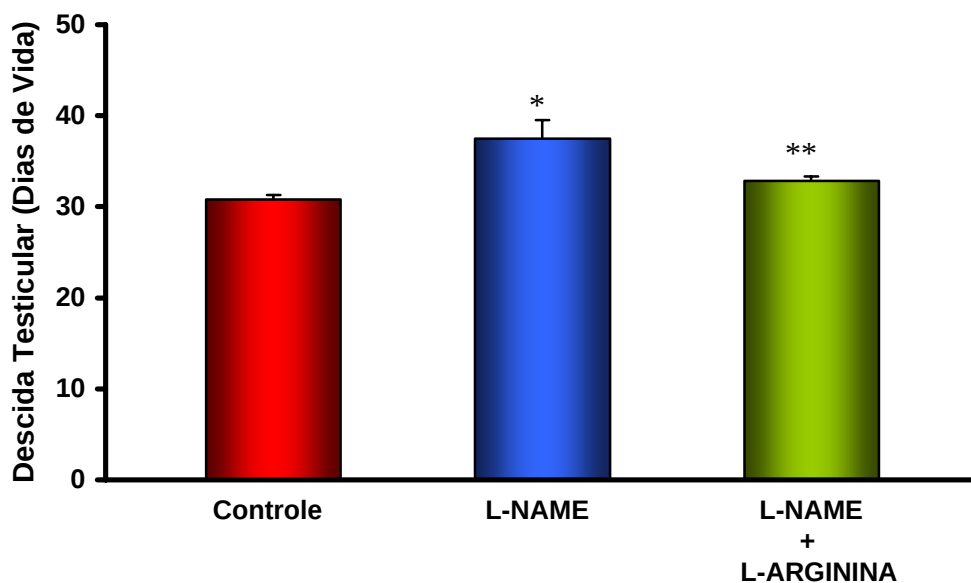


Figura 7. Efeito do L-NAME (20 mg/Kg/dia; v.o. durante 10 dias) no tempo de descida testicular em ratos imaturos (a partir dos 20 dias de vida) e reversão do retardo da descida testicular pela administração de L-arginina (600 mg/Kg/dia; i.p. durante 10 dias). * $p < 0,05$, teste t de Student bicaudal não pareado *versus* controle. ** $p < 0,05$, teste t de Student bicaudal não pareado *versus* L-NAME.

4.2 – Emissão Seminal

4.2.1 – Emissão seminal induzida por pilocarpina

A resposta ejaculatória obtida através do tratamento com a pilocarpina (0,75, 1,5 e 3 mg/kg/dia) está demonstrada na figura 8. A injeção intraperitoneal (i.p.) da referida droga causou uma ejaculação dose-dependente nos ratos, tendo-se obtido o efeito máximo na dose de 3 mg/kg. O número de gotas de sêmen observado nas respectivas doses de pilocarpina durante o período de 60 minutos, foi da ordem de $0,88 \pm 0,30$, $2,00 \pm 0,35$ e $8,25 \pm 1,20$ gotas. A dose de 3 mg/kg de pilocarpina foi utilizada para estudar a participação do NO na emissão seminal.

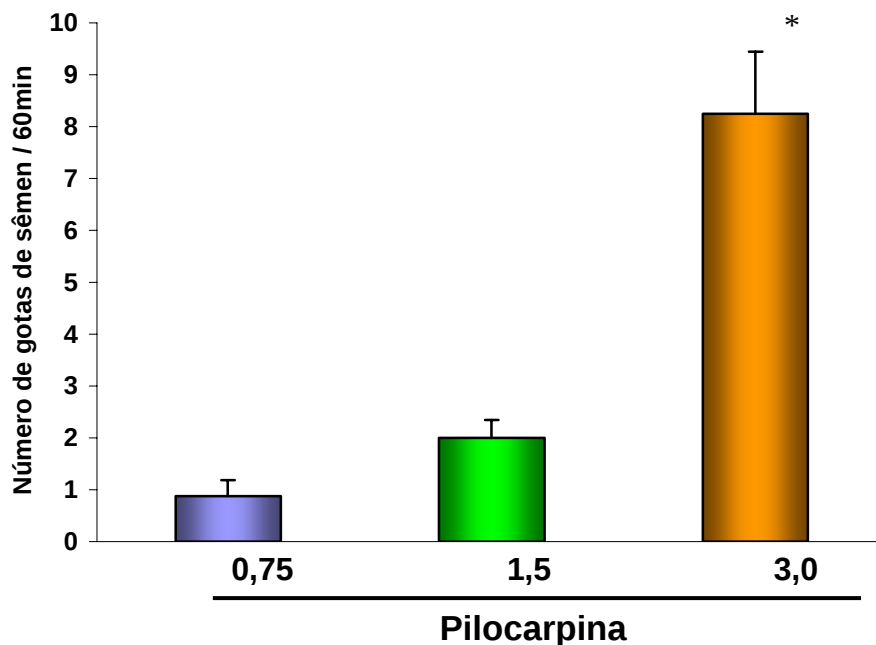


Figura 8. Emissão seminal induzida pela pilocarpina (0,75, 1,5 e 3 mg/Kg; i.p.). O número de gotas de sêmen foram registrados por 60 minutos. Cada coluna representa a médias de 8-10 animais e as barras verticais expressam o erro padrão da média. * $p < 0,001$ comparado com animais grupo de animais tratados com 0,75 e com 1,5 mg/Kg.

4.2.2 – Efeito da atropina e do L-NAME na emissão seminal induzida pela pilocarpina

A figura 9 ilustra a emissão seminal induzida pela pilocarpina (3mg/kg, i.p.) e o efeito do pré-tratamento com a atropina (5 e 10mg/kg, s.c.) e com o L-NAME (5, 10 e 20mg/kg, v.o.) sobre a mesma. A atropina bloqueou a resposta a pilocarpina de forma significativa na dose de 5mg/kg, enquanto que a dose de 10mg/kg promoveu um bloqueio quase completo da resposta ejaculatória. De forma dose-independente, o L-NAME (5, 10 e 20mg/kg, s.c.), também diminuiu a emissão seminal induzida pela pilocarpina.

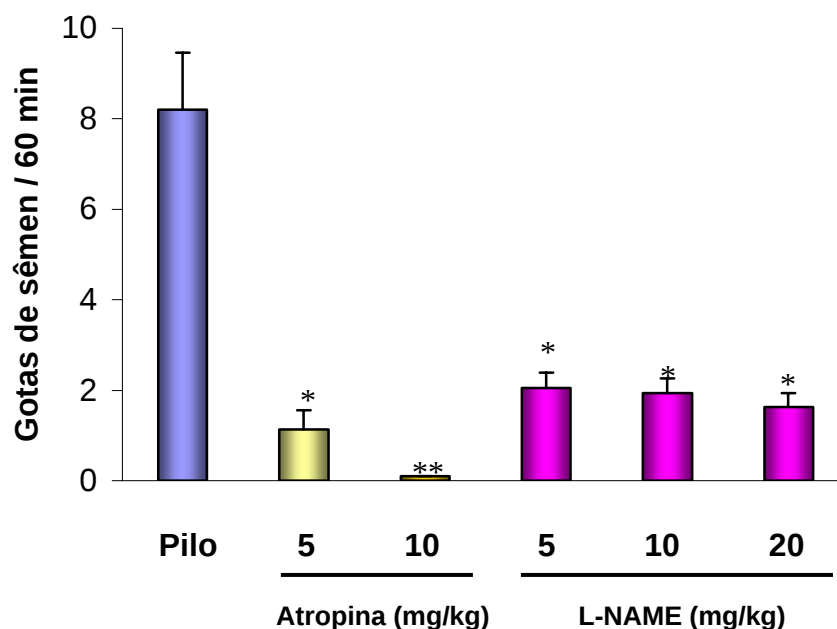


Figura 9. Emissão seminal induzida por pilocarpina (3 mg/Kg; i.p) em animais pré-tratados por via subcutânea com veículo (salina; 1 ml/Kg) , atropina (5 e 10 mg/Kg) ou L-NAME (5, 10 e 20 mg/Kg). As colunas e barras verticais expressam a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos seis animais. * $p < 0,001$ comparado com controle, ANOVA one-way seguido de teste de Student Newman-Keuls para comparações múltiplas. ** $p < 0,001$ comparado com dose de 5 mg/Kg. ANOVA one-way seguido de teste de Student Newman-Keuls para comparações múltiplas

4.2.3 – Reversão pela L-arginina e nitroprussiato de sódio da emissão seminal induzida pela pilocarpina

A figura 10 mostra o efeito inibitório do L-NAME na emissão seminal induzida pela pilocarpina em ratos e sua reversão pela L-arginina e pelo nitroprussiato de sódio. O pré-tratamento com o L-NAME (5mg/kg, s.c.) causou uma diminuição altamente significativa da emissão seminal induzida pela pilocarpina (3mg/kg, i.p.). O efeito do L-NAME foi significativamente revertido pela concomitante administração da L-arginina (600mg/kg, s.c.) e pelo nitroprussiato de sódio (0,5mg/kg, s.c.).

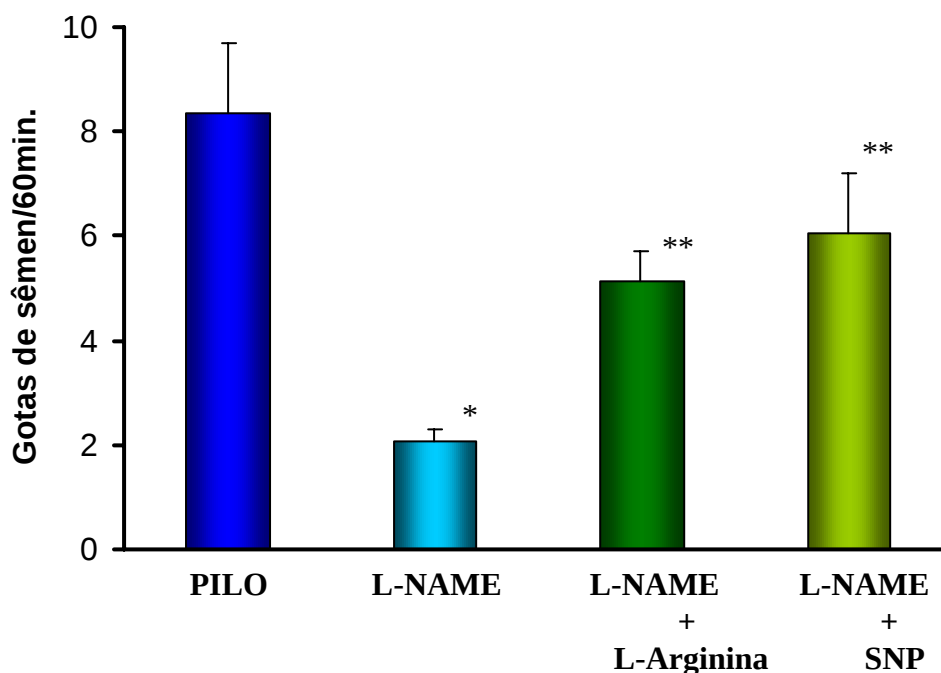


Figura 10. Efeito da L-arginina e nitroprussiato de sódio na emissão seminal induzida por pilocarpina (3 mg/Kg; i.p). Os animais foram pré-tratados com salina (1 ml/Kg; s.c), atropina (5 e 10 mg/Kg; s.c), L-NAME (5 mg/Kg; s.c), L-NAME e L-arginina (5 e 600 mg/Kg; s.c, respectivamente) ou L-NAME e nitroprussiato de sódio (5 e 0,5 mg/Kg; s.c, respectivamente) 15 minutos antes da administração de pilocarpina. * $p < 0,001$ comparado com animais tratados com salina. ** $p < 0,05$, comparado com animais tratados com L-NAME.

4.2.4 – Dosagem de nitrito/nitrato

Os níveis de nitrito/nitrato em ratos normais (grupo controle) e em ratos tratados somente com pilocarpina ou na combinação de L-NAME ou de nitroprussiato de sódio mais L-NAME estão representados na figura 11. Comparado ao grupo controle ($285,5 \pm 45,6\mu\text{M}$), os animais tratados com pilocarpina (3mg/kg, i.p.) apresentaram um aumento significativo na concentração urinária de $\text{NO}_3/\text{NO}_2^-$ ($496,7 \pm 58,0\mu\text{M}$). O pré-tratamento com L-NAME (5mg/kg, s.c.) aboliu completamente o aumento dos níveis de $\text{NO}_3/\text{NO}_2^-$ induzidos pela pilocarpina. Essa resposta do L-NAME sobre o efeito da pilocarpina foi bloqueada, quando realizou-se a administração concomitante de nitroprussiato de sódio (0,5mg/kg, s.c.).

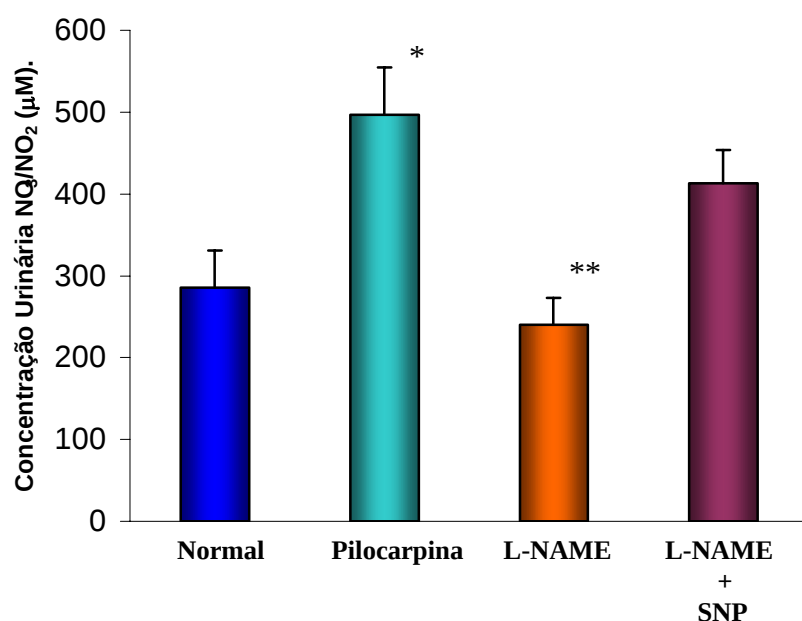


Figura 11. Níveis urinários de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ em ratos controle (normal) e em ratos tratados com pilocarpina (3 mg/Kg; i.p), L-NAME (5 mg/Kg; s.c) ou em animais pré-tratados com L-NAME e nitroprussiato de sódio (5 e 0,5 mg/Kg; s.c) 15 minutos antes da administração de pilocarpina. Cada coluna representa a média de seis animais e as barras verticais expressam o erro padrão da média. * $p < 0,001$ comparado com grupo de animais controle. ** $p < 0,05$ comparado com animais tratados apenas com pilocarpina.

4.3 – Inibição crônica da óxido nítrico sintetase

4.3.1 – Medição da pressão arterial

Com a finalidade de avaliar a eficácia do tratamento crônico com o L-NAME (40mg/kg /dia, v.o.), inibidor da NOS, objetivando-se a inibição da síntese do NO, foram realizadas aferições das pressões arteriais dos grupos controle e tratado. A figura 12 demonstra, que após oito semanas de tratamento com o referido inibidor, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da pressão arterial dos animais tratados, quando comparados ao grupo controle, que manteve-se normotenso ($126,2 \pm 8,70$ mmHg e $163,7 \pm 5,26$ mmHg, grupo controle e tratado, respectivamente).

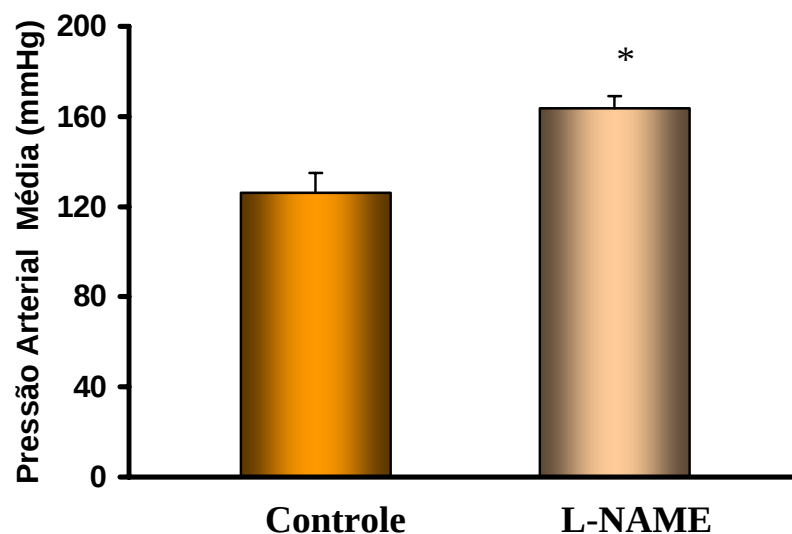


Figura 12 – Pressão arterial média de ratos Wistar normotensos tratados com L-NAME (40 mg/Kg/dia, v.o por 56 dias comparado com ratos Wistar normotensos controle. Cada coluna representa a média de dez animais e as barras verticais expressam o erro padrão da média. * $p < 0,001$, teste t de Student não pareado bicaudal comparado com grupo de animais controle.

4.3.2 – Efeito da inibição crônica da NOS no comportamento sexual de ratos machos

Ao avaliarmos os efeitos da inibição crônica da NOS utilizando o L-NAME (40mg/kg, v.o.) no comportamento de cobertura de ratos machos, observamos que a latência de monta e intromissão, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) desse parâmetro, quando comparamos os grupos controle e tratado. A frequência de monta, bem como a frequência de intromissão, diminuíram significativamente ($p < 0,05$), quando comparamos os grupos controle e tratado. Os resultados estão demonstrados nas figuras 13 e 14. Não foram constatadas ejaculações em nenhum dos animais tratados com L-NAME. Entretanto, todos os animais do grupo controle (tratados com salina), ejacularam ($p < 0,001$).

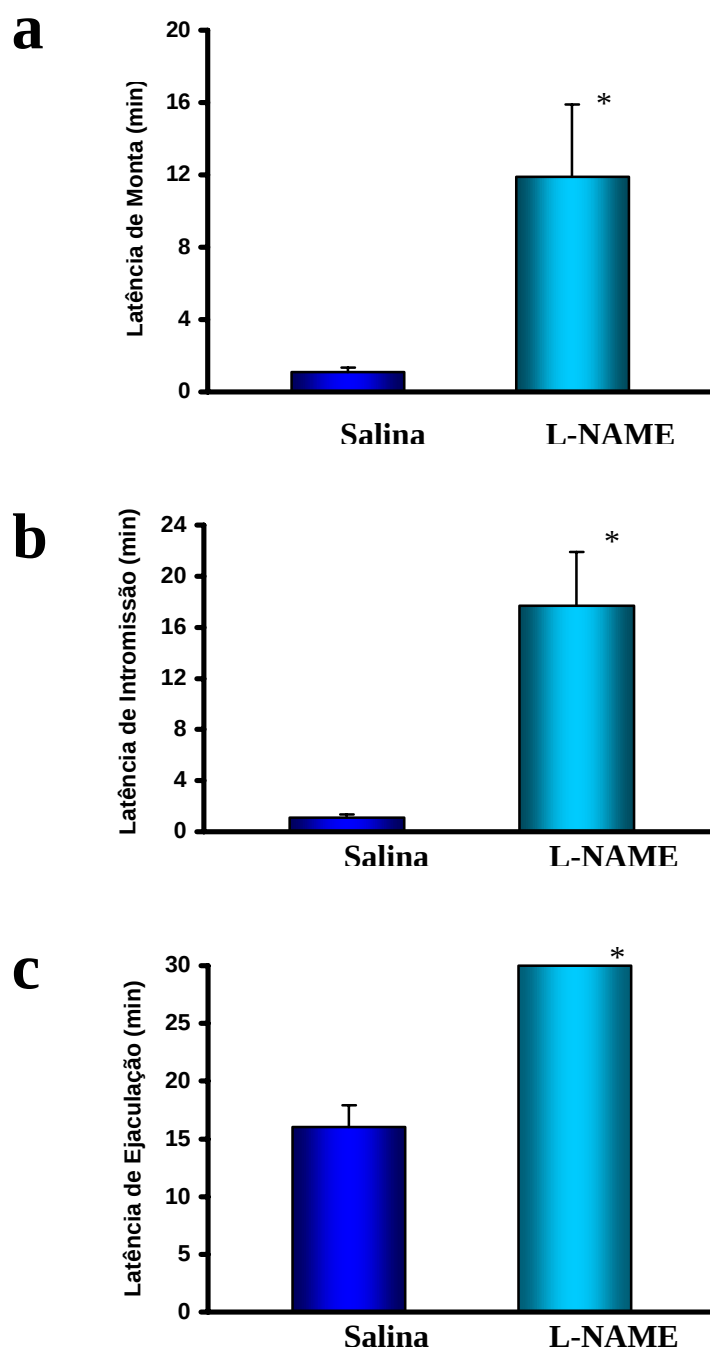


Figura 13. Efeito do tratamento crônico com L-NAME (40 mg/Kg/dia, v.o durante 56 dias) na latência de monta (a), intromissão (b) e ejaculação (c) de ratos. Os animais foram observados por 30 minutos na presença de fêmeas tratadas com 17- β -estradiol e progesterona (para aumentar receptividade) em gaiola única na proporção de 1:1. Cada coluna representa a média de dez animais e as barras verticais expressam o erro padrão da média. * $p < 0,001$, teste t de Student não pareado bicaudal comparado com grupo de animais controle tratados com salina (1 ml/Kg; v.o durante 56 dias).

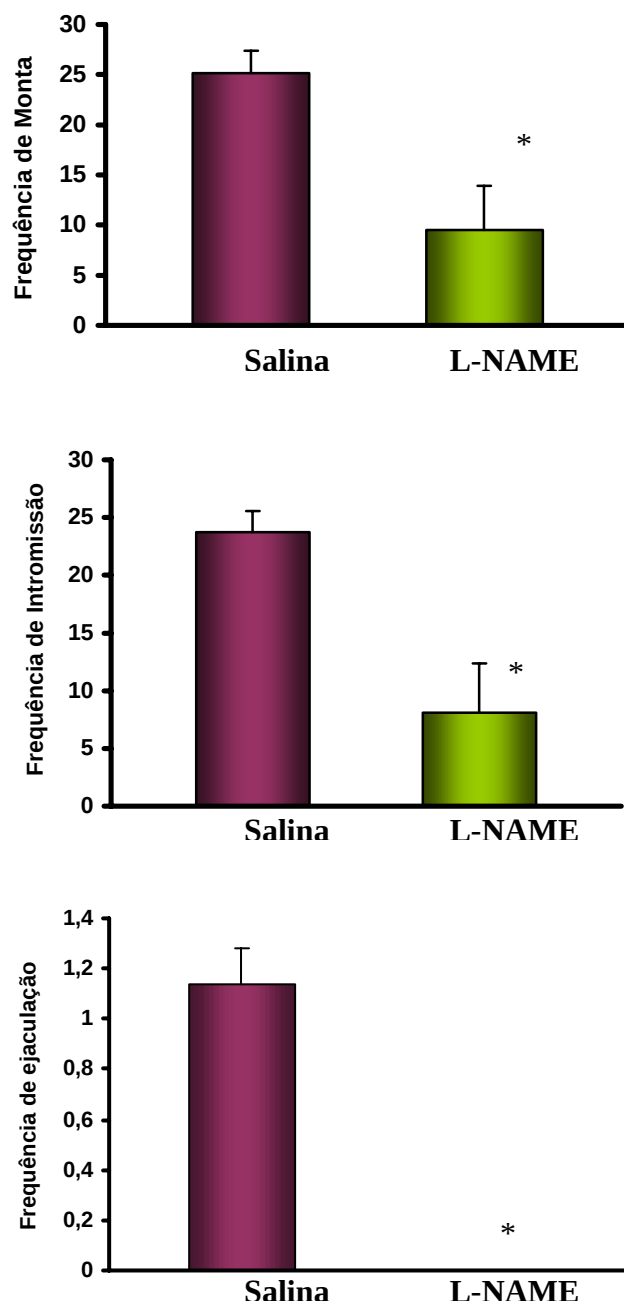


Figura 14. Efeito do tratamento crônico com L-NAME (40 mg/Kg/dia, v.o durante 56 dias) na frequência de monta (a), intromissão (b) e ejaculação (c) de ratos. Os animais foram observados por 30 minutos na presença de fêmeas tratadas com 17- β -estradiol e progesterona (para aumentar receptividade) em gaiola única na proporção de 1:1. Cada coluna representa a média de dez animais e as barras verticais expressam o erro padrão da média. * $p < 0,001$, teste t de Student não pareado bicaudal comparado com grupo de animais controle tratados com salina (1 ml/Kg; v.o durante 56 dias).

4.3.3.- Efeito da inibição crônica da NOS na fertilidade de ratos machos

Quando os animais tratados com L-NAME (40mg/kg, v.o.) foram submetidos ao acasalamento com a fêmeas de fertilidade comprovada, somente 8 das 10 fêmeas apresentaram o tampão gelatinoso vaginal (“vaginal plug”), enquanto todos os animais pertencentes ao grupo controle demonstraram a ocorrência do mesmo. Ao contrário do grupo controle, as fêmeas acasaladas com machos tratados com L-NAME (40mg/kg, v. o.), apresentaram alto índice de morte e/ou reabsorção fetal, bem como a ocorrência de dois casos de fetos teratogênicos (Figura 15). Foram observados somente 22 fetos vivos no grupo tratado contra 103 fetos vivos do grupo controle. O peso fetal foi maior no grupo tratado em ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito da inibição da NOS na fertilidade de ratos machos tratados com L-NAME

Grupos	No.de ratas com tampão vaginal	No.de ratas com fetos vivos	No. De fetos vivos	No. de fetos por rata prenhe	Peso fetal Média ± EPM
Controle (10)	10	10	103	10.30±0.6	3.017±0.050
L-NAME (10) (40 mg/kg, v.o.)	8	2	22	11.00±0.0	3.920±0.130*

*p<0,05 vs. Controle (n) número de animais.

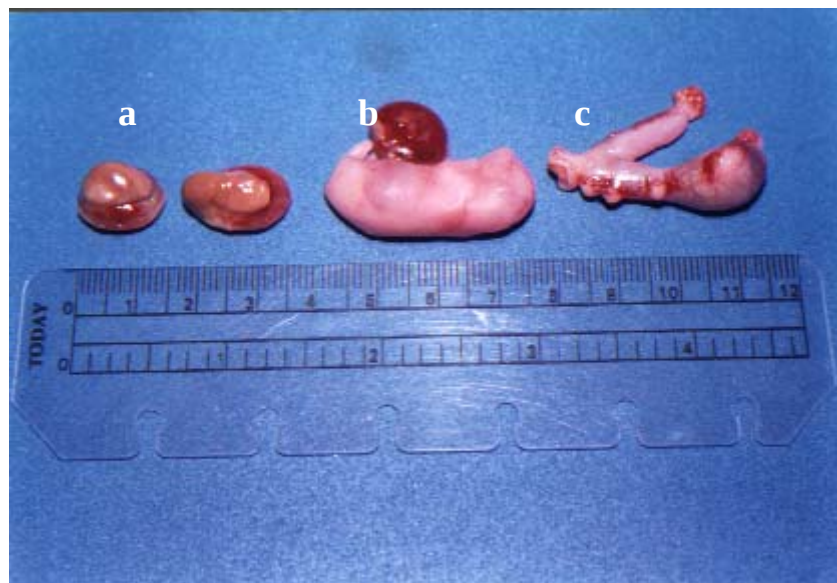


Figura 15. Efeito teratogênico observado em fetos de fêmeas que foram acasaladas com machos tratados com L-NAME (40 mg/Kg/dia; v.o durante 56 dias) (a) contrastado com feto normal (b) e com útero contendo pontos de reabsorção (c). Para maiores detalhes ver texto.

4.3.4.- Peso corporal e peso relativo do epidídimo, próstata e vesícula seminal.

Não houve diferença entre os grupos controle e tratado com relação aos pesos corporais. Epidídimos, próstatas e vesículas seminais, também não demonstraram diferenças quanto ao parâmetro peso, quando comparamos os grupos controle e tratado (Figura 16).

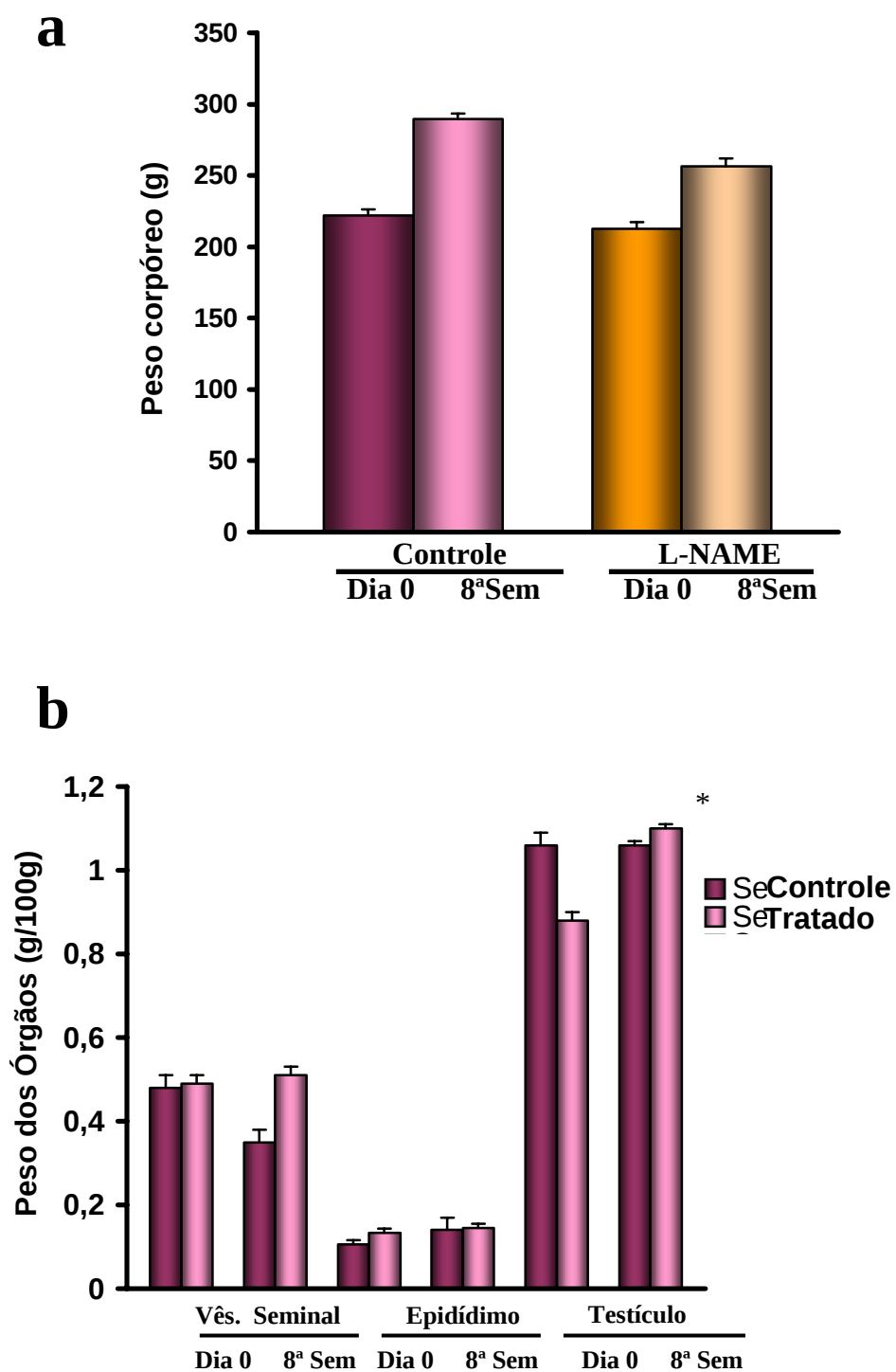


Figura 16. Peso corporal (a) e relativo de órgãos genitais masculinos (b) de animais tratados cronicamente com L-NAME (40 mg/Kg/dia, v.o durante 56 dias). * $p < 0,001$ comparado com controle antes do início do tratamento com L-NAME.

4.3.5. – Histologia Testicular

4.3.5.1. – Microscopia Óptica

Embora os cortes histológicos dos testículos de animais tratados com L-NAME (40mg/kg, v. o.) não tenham apresentado diferenças quanto aos efeitos da droga nos estágios do ciclo espermatogênico, houve uma redução focal do número de espermatogônias e espermatócitos na porção periférica do parênquima testicular. A porção central do parênquima não apresentou lesões histológicas por efeito do tratamento (Figura 17). Observamos uma discreta diminuição do número das células de Leydig de $14,4 \pm 1,53$ para $12,4 \pm 1,52$, quando comparamos grupos controle e tratado.

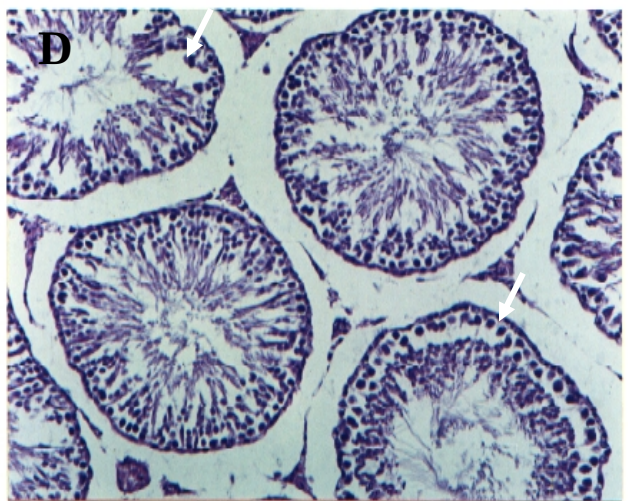
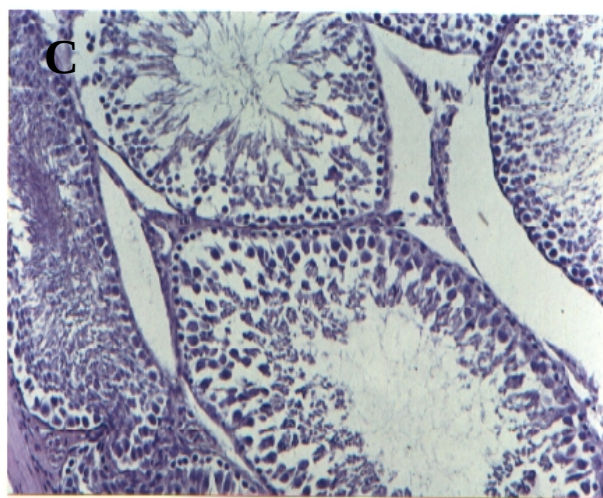
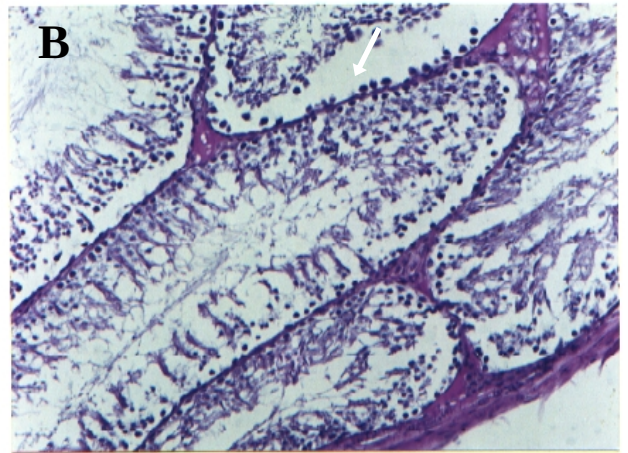
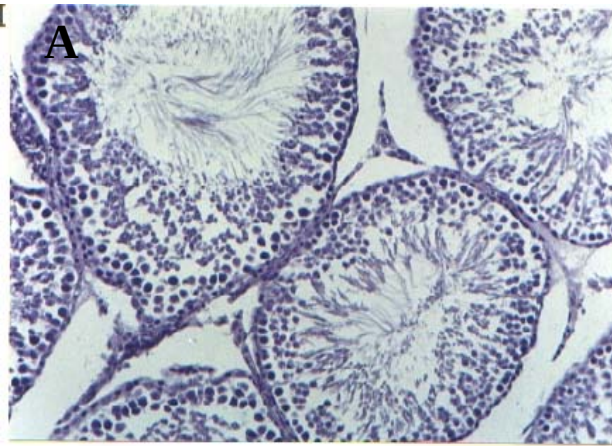


Figura 17 - Achados histológicos no testículo de animais tratados com salina 0.9% (10ml/kg/dia, v.o.) ou L-NAME (40 mg/Kg/dia, v.o) durante 56 dias. No painel a é mostrado a porção periférica de tecidos de animais controle e no painel b a porção periférica de animais tratados com L-NAME. As setas em b e em d (cortes de animais tratados) indicam que há um comprometimento do epitélio dos túbulos seminíferos, com diminuição das espermatogônias e espermatócitos. Em c é mostrado um corte de porção central do parênquima testicular de animais controle e em d a mesma porção em animais tratados. Coloração pelo HE, aumento de 40 x.

4.3.5.2.- Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica revelou alterações das membranas celular e nuclear, onde observamos enrugamento das mesmas nas células de Leydig e Sertoli (Figura 18 **b** e **d**). Vacúolos citoplasmáticos, indicativo de processos degenerativos, também estão presentes nesses tipos celulares, porém de forma mais evidentes nas células de Leydig. Dentre as organelas citoplasmáticas, observamos um comprometimento da integridade mitocondrial, como rareamento das cristas mitocondriais das células de Leydig (Figura 18 **b**). As espermatogônias não apresentaram alterações estruturais, porém detectamos deformidade na estrutura do capuz acrossomático das espermátides com acentuada alteração da membrana do mesmo (Figura 19 **b**).

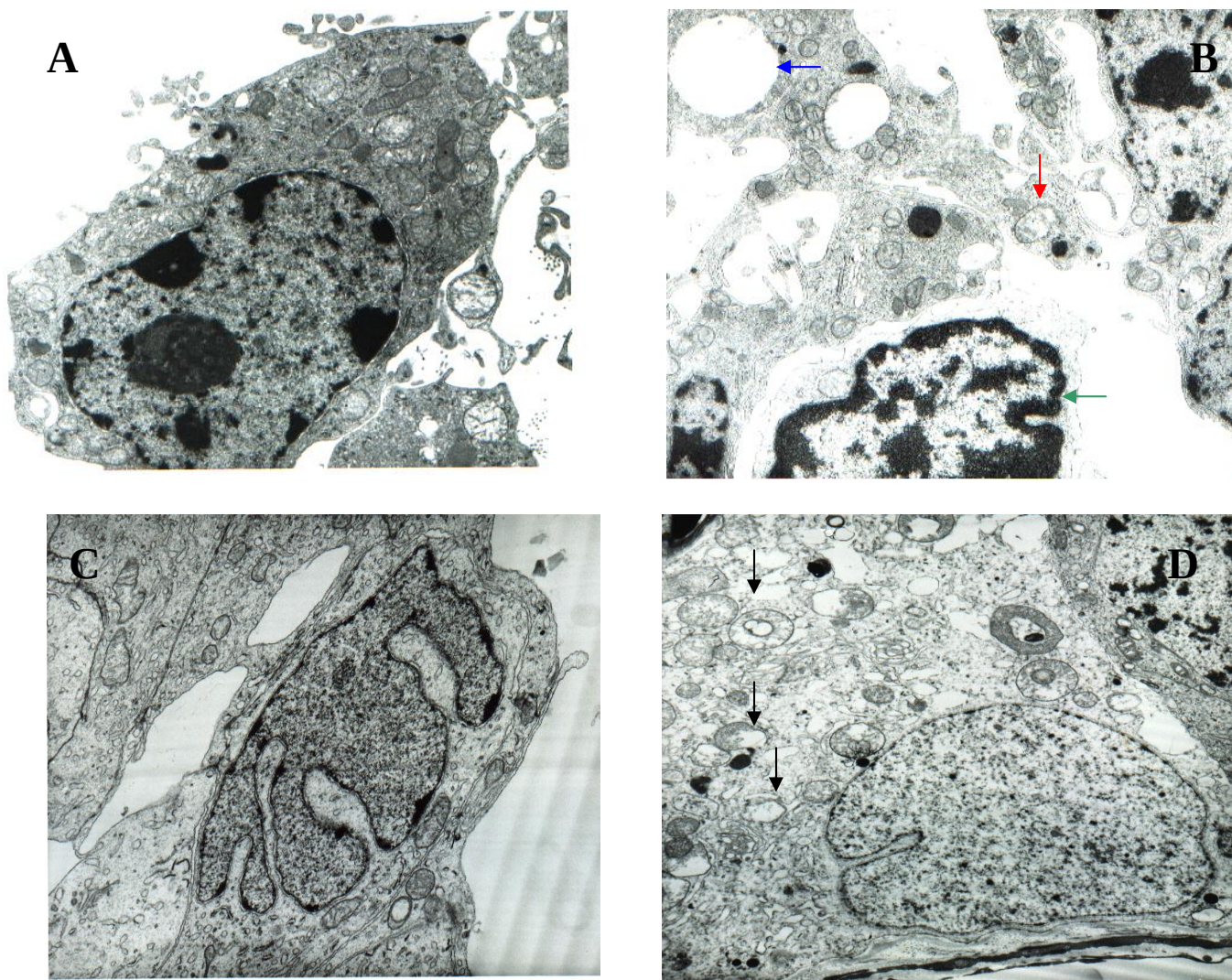


Figura 18. Microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 12.000 x de células de Leydig de animais controle (a) e de animais tratados com L-NAME na dose de 40 mg/Kg, v.o durante 56 dias (b). As setas azul, vermelho e verde, respectivamente, indicam presença de vacúolos, rareamento das cristas mitocondriais e enrugamento da membrana do nucléolo. Os painéis (c) e (d) representam células de Sertoli de animais tratados com salina ou com L-NAME no mesmo protocolo descrito acima demonstrando nos pontos evidenciados por setas a presença de mitocôndrias com rareamento de cristas.

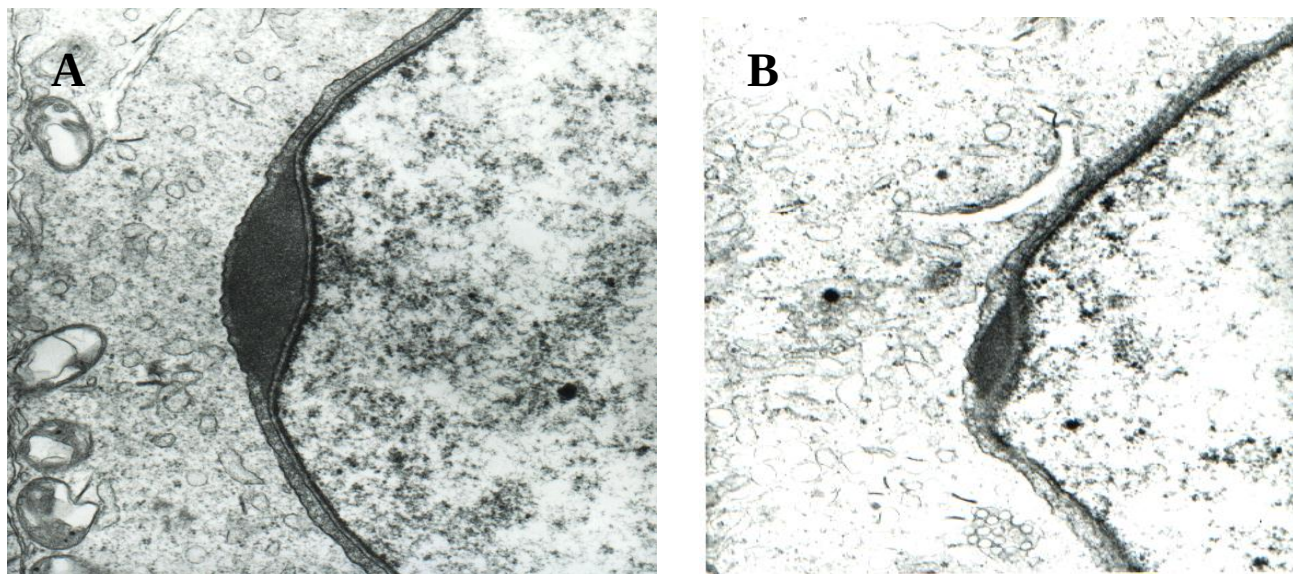


Figura 19. Microscopia eletrônica de transmissão com aumento de 31.500 x de espermátides de animais controle (a) e em (b) animais tratados com L-NAME (40 mg/Kg/dia, v.o durante 56 dias) onde foi possível evidenciar a completa deformidade da estrutura do capuz acrossomático com enrugamento e descontinuidade da membrana.

4.3.6 -Morfologia e Concentração Espermática

O tratamento com o L-NAME demonstrou um efeito deletério sobre a espermatogênese, considerando-se que os espermatozóides coletado da porção caudal do epidídimo, ao serem analisados, apresentaram uma concentração diminuída de $13,70 \pm 1,28 \times 10^4$ células/mm³ para $5,70 \pm 1,06 \times 10^4$ células/mm³ ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo controle após oito semanas de tratamento (Figura 20).

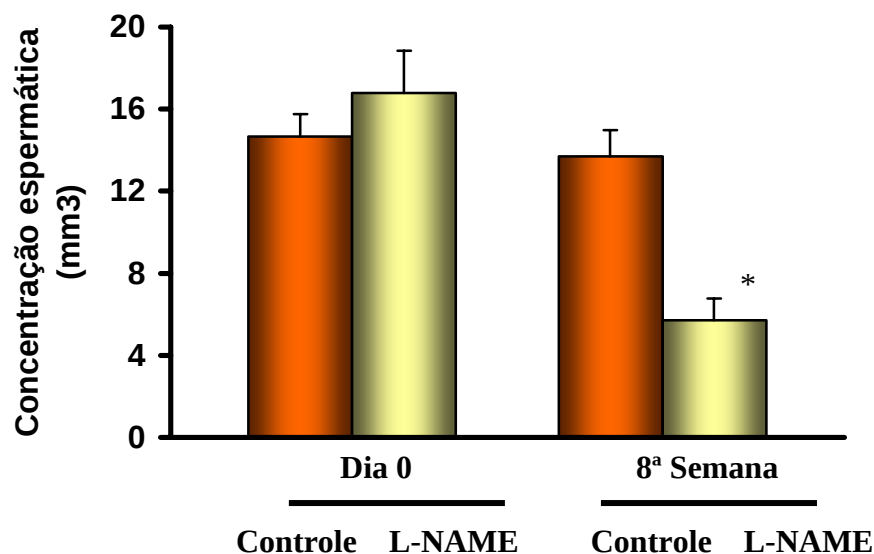


Figura 20. Efeito do tratamento crônico com L-NAME(40mg/kg/dia, v.o., durante 56 dias) na concentração espermática. O material foi coletado da cauda do epidídimo. * $p < 0,001$, teste t de Student não pareado comparado com controle tratado com salina.

Quanto a morfologia dos espermatozoides, observou-se que após 56 dias de tratamento com o L-NAME houve um aumento das patologias de cabeça, tanto no grupo controle, quanto no tratado, porém somente no último este se deu de forma significativa. Dentre as patologias de cabeça foram consideradas as formas isoladas, estreita na base e as que não apresentavam a forma de gancho (Figura 21 **b**). As anomalias de cauda também foram evidenciadas com aumento de caudas dobradas e fortemente dobradas sem no entanto serem estatisticamente significativas (Figura 21 **c** e **d**). Os valores de anomalias encontradas nos animais tratados com salina foram $1,66 \pm 0,33$ antes do início do tratamento e $2,12 \pm 0,22$ após oito semanas de tratamento com salina, enquanto que nos ratos do grupo L-NAME o número de anomalias de cabeça foi de $2,35 \pm 0,16$ antes do início do tratamento e $6,30 \pm 0,28$ ($p < 0,05$ vs. controle) após 56 dias de administração da droga (Figura 22).

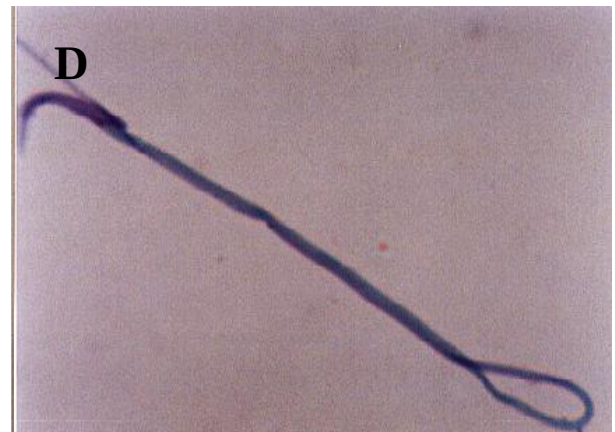
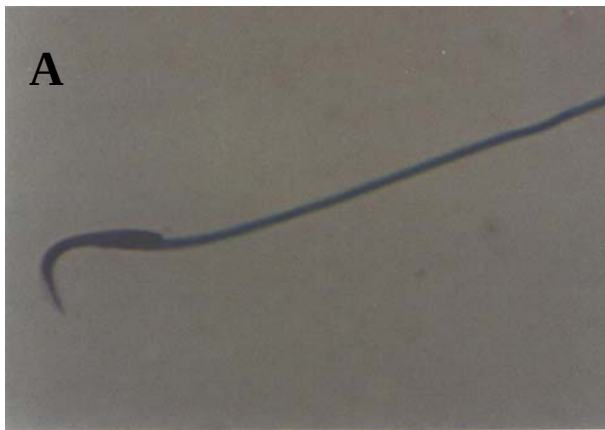


Figura 21. Fotos de microscopia óptica (Papanicolau, com aumento de 100x) mostrando anormalidades espermáticas. No painel (a) é mostrado um espermatozóide normal de animais controle e em (b) uma cabeça isolada, uma ocorrência comum nos animais tratados cronicamente com L-NAME. Os painéis (c) e (d) mostram espermatozóides com caudas dobrada e fortemente dobrada, respectivamente.

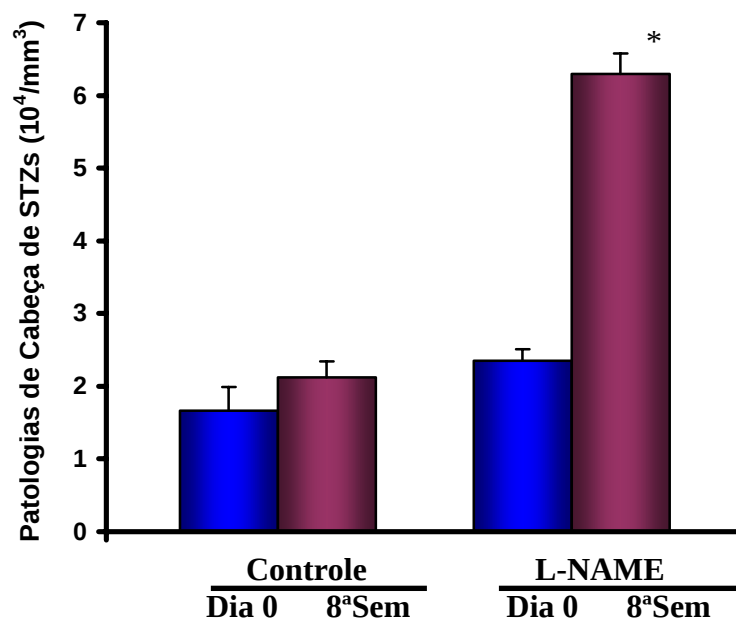
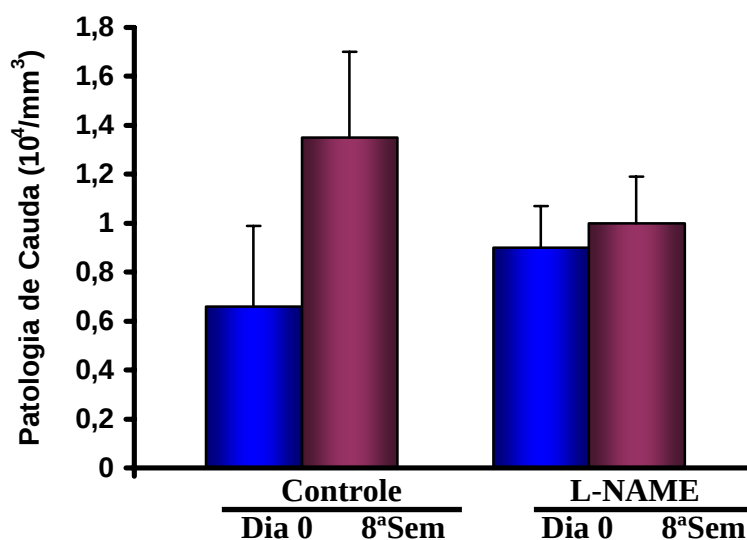
a**b**

Figura 22. Anormalidades de cabeça (a) e cauda (b) de espermatozoides de animais controle e tratados cronicamente com L-NAME (40mg/kg/dia, v.o., durante 56dias). O material coletado do epidídimo foi diluído na proporção de 1:20, retirando-se uma gota para esfregaço em lâmina de vidro, que posteriormente foi corada pelo Papanicolau. Foram contados 200 espermatozoides.* $p < 0,05$ comparado controle e tratado.

4.3.7.- Dosagem de Testosterona Plasmática

Com o intuito de avaliar os efeitos da inibição crônica da óxido nítrico sintetase, utilizando L-NAME (40mg/kg/dia, v.o., durante 56 dias), sobre o eixo hipotalâmico- hipofisário- gonadal e subsequente liberação de gonatodrofinas e síntese de andrógenos, ao final do tratamento, coletamos amostras de sangue, que foram submetidas a centrifugação para separação do soro e posterior dosagem da testosterona sérica através de técnica de radioimunoensaio. A dosagem revelou uma diminuição significativa dos níveis de testosterona entre os animais do grupos controle e tratado ($2,08 \pm 0,37$ e $0,48 \pm 0,07$, respectivamente) (Figura 23).

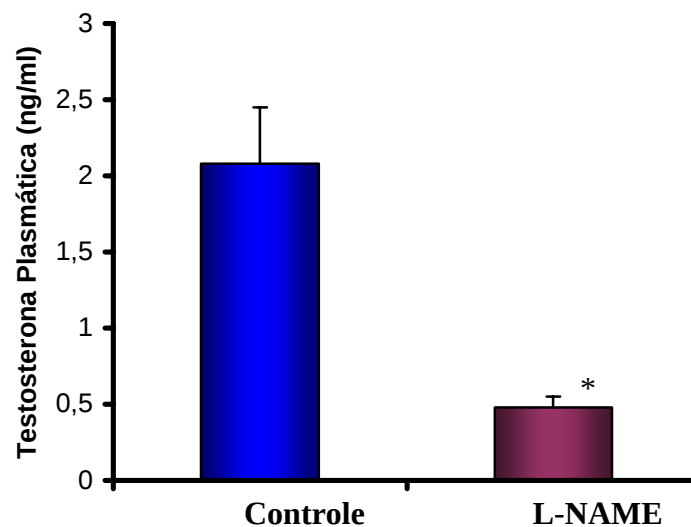


Figura 23. Efeito da inibição crônica da óxido nítrico sintetase nos níveis de testosterona sérica. Os animais foram tratados com L-NAME (40 mg/kg/dia, v.o., durante 56 dias). $p < 0,001$ comparando o grupo controle ao tratado.

6. DISCUSSÃO

Este estudo foi delineado para investigar os efeitos do N^{G} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da NOS em ratos, utilizando diferentes sistemas experimentais com o intuito de avaliar o papel do NO como regulador da função reprodutiva.

O sistema reprodutivo masculino produz e armazena os gametas masculinos. Os gametas masculinos ou espermatozóides são produzidos no testículo e estocados no epidídimo. O pênis têm a função de proporcionar o mecanismo a entrega, enquanto as glândulas acessórias contém várias secreções, que ajudam no transporte dos espermatozóides.

O controle endócrino da descida testicular em mamíferos é pouco conhecido. No cérebro, o NO ativa a liberação de LHRH, que alcança a pituitária e ativa a liberação de gonadotrofina (Rettori et al., 1993). Observações experimentais e clínicas indicam, que a descida testicular é um evento mediado por andrógenos diretamente regulado por gonadotrofinas hipofisárias (Rajfer & Welsh, 1977). Acredita-se que a descida testicular seja um processo bifásico, migrando primeiramente, das proximidades do polo inferior do rim para o hipogástrio (descida intra-abdominal) e uma segunda fase, migrando através do canal inguinal para o escroto (descida ínguino-escrotal) (Hutson, 1985). O metabólito androgênico ativo em ambas as fases parece ser a dihidrotestosterona, que é sintetizada pelos testículos e deve estar presente em altas concentrações

locais para ser efetivo (Spencer et al., 1993; Lin et al., 2001). Tem sido feita a hipótese, de que a descida testicular ocorra como resultado da secreção de descendina um testículo normal e sua secreção resulte em crescimento seletivo de células do gubernáculo. O desenvolvimento do gubernáculo resulta em masculinização dos elementos do canal inguinal. No início da descida testicular, o processo patente migra para o canal inguinal, gerando uma pressão intra-abdominal sobre o gubernáculo, que por sua vez exerce ação sobre os testículos para descerem ao canal inguinal. A descida dos testículos para dentro e através do canal inguinal é uma etapa intermediária entre a pressão intra-abdominal transmitida pelo processo vaginal a regressão do gubernáculo induzida por andrógenos. É possível que andrógenos sob controle do eixo hipotalâmico-hipofisário preservado de fetos altere as propriedades viscoelásticas do gubernáculo, criando uma pressão intra-abdominal, que empurra os testículos para dentro do saco escrotal (Levy & Husmann, 1995).

Neste estudo, o papel do NO na descida testicular foi verificado tratando-se ratos machos com 20 dias de idade com L-NAME (20 mg/kg/dia) por um período de 10 dias. Esta dose de L-NAME fora capaz de mostrar ser a causa da inibição de NOS cerebral (Faria et al., 1997). O tratamento com L-NAME causou um retardo significativo na descida testicular comparado ao controle tratado com salina. Além disso, o efeito causado pelo L-NAME foi completamente revertido pela L-arginina, um substrato para a biossíntese do NO, sugerindo que o NO tem função de modulação na referida descida testicular. Embora o mecanismo preciso da sua participação na descida testicular não tenha sido esclarecido neste

estudo, esta é a primeira verificação mostrando claramente, evidências de que o tratamento de ratos machos imaturos com inibidor de NOS afeta a maturação sexual (puberdade) avaliada através da medida do período de tempo transcorrido para a descida testicular, demonstrando a participação do NO na descida testicular.

É bastante conhecido que, o comportamento sexual em ratos machos é regulado por vários sistemas neurotransmissores (Bitran & Hull, 1987). A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor participante no comportamento sexual e drogas colinérgicas como a fisostigmina e a pilocarpina induzem ejaculação em ratos, que pode ser bloqueada por atropina (Stief et al., 1989; Zarrindast et al., 1994), indicando que este efeito é mediado por um mecanismo colinérgico central. Demonstrou-se, que a administração de baixas doses de agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina e lisurida, induzem ereção peniana e facilitam a emissão seminal em ratos, efeitos estes, que podem ser antagonizados pela sulpirida, um antagonista dopaminérgico (Benassi-Benelli et al., 1979; Zarrindast et al., 1994). Esses achados indicam uma possível interação entre neurônios dopaminérgicos e colinérgicos centrais para indução da ejaculação, emissão seminal ou ambas, porém com mecanismos subjacentes obscuros. Devido a vasta distribuição de fibras NOS ao longo dos neurônios eferentes parassimpáticos, é razoável conjecturar, que o NO liberado durante a estimulação colinérgica pode mediar a neurotransmissão inibitória responsável pela emissão seminal. Drogas colinérgicas como a pilocarpina, podem estimular a emissão seminal através de um mecanismo, possivelmente envolvendo NO, agindo

em sítios centrais e periféricos. O presente estudo verificou a hipótese de que a via L-arginina/óxido nítrico participe da resposta estimulatória da pilocarpina na emissão seminal. Os resultados mostram que a pilocarpina, um agonista colinérgico, pode estimular a emissão seminal em ratos, a qual pode ser antagonizada completamente pela atropina, um antagonista muscarínico não seletivo, indicando a participação de um mecanismo colinérgico. Esta observação é consistente com os achados prévios de Zarrindast et al. (1994). A estimulação da emissão seminal induzida por pilocarpina foi inibida pelo L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS (Moncada et al., 1991), indicando a participação do NO na mediação do seu efeito. Além disso, o efeito inibitório do L-NAME na emissão seminal induzida por pilocarpina pode ser efetivamente revertido em animais tratados com excesso de substrato de L-arginina ou com nitroprussiato de sódio, um doador putativo de NO. O possível comprometimento do sistema L-arginina/óxido nítrico na ação da pilocarpina é sugerido anteriormente pelo aumento dos níveis de nitrito/nitrato ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) urinário, produtos da oxidação do NO, e sua inibição por ação do L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS.

O NO provavelmente medeia a neurotransmissão inibitória responsável pela emissão seminal induzida por pilocarpina em ratos agindo em sítios nervosos centrais e periféricos. Sugere-se que a ereção peniana e a emissão seminal sejam mediadas por dois mecanismos distintos e a área hipotalâmica pré-óptica medial (MPOA), parece ser o provável local de integração de mecanismos reflexos medulares. A MPOA participa da modulação da motivação sexual (Hull et al., 1997), e estudos recentes confirmaram a existência de neurônios

contendo NOS na MPOA, no núcleo parassimpático do rato e no gânglio pélvico principal, que fornece eferentes pós-ganglionares para os órgãos urogenitais (Vizzard et al., 1994; Hamilton et al., 1995; Persson et al., 1998). Na MPOA, efeitos mediados por receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2, foram sugeridos ser antagonistas entre si e ter diferentes limiares de ativação. Por exemplo, enquanto baixos níveis de estimulação dopaminérgica sobre receptores D1 modulam positivamente a ereção controlada pelo sistema parassimpático, a estimulação em níveis mais altos dos receptores D2, modulam positivamente a emissão seminal controlada pelo sistema nervoso simpático, explicando assim, a progressão da ereção para o mecanismo ejaculatório (Hull et al., 1992). A quinolorana, um agonista de receptores dopaminérgicos ministrados sistemicamente ou diretamente na MPOA, foi sugerida como inibidora da ereção peniana, porém com ação facilitatória da emissão seminal (Bazzett et al., 1991). Um efeito facilitatório da estimulação muscarínica no comportamento sexual requer a participação de testosterona (Renata Marquez e Velasquez Montezuma, 1997). A testosterona é responsável pela regulação crescente da síntese de NO na MPOA e de facilitar a liberação de dopamina nesta área em ratos normais, mas não em animais castrados (Hull et al., 1997). Esses achados sugerem, que há a possibilidade de a pilocarpina facilitar a emissão seminal através da aceleração da liberação de dopamina mediada por NO na MPOA. Todavia, estudos adicionais são requeridos para indentificar a natureza precisa da interação entre neurônios colinérgicos e dopaminérgicos na MPOA para a indução da emissão seminal.

O NO funciona como um agente neurotransmissor não adrenérgico não colinérgico (NANC) no trato urogenital (Burnett et al., 1995). Tem sido proposto por exemplo, que o NO quer seja liberado pelos neurônios NANC, ou formado no endotélio ou no músculo liso, estimula a formação de GMPc no músculo liso do corpo cavernoso, que por sua vez relaxa a musculatura e permite ao sangue fluir para o corpo cavernoso causando a ereção (Holmquist et al., 1992). A emissão seminal e a ejaculação, são tidas como primariamente mediadas por catecolaminas (Benson et al., 1988). Contudo, os efeitos andrenérgicos, que regulam o processo ejaculatório, podem ser modulados por NO, assim como por estimulação colinérgica. Devido a demonstração por técnicas imunohistoquímicas da presença de abundantes fibras neuronais NOS positivas na parte terminal do canal deferente e no ducto ejaculatório, o NO possivelmente atuando através de neurotransmissão inibitória, possa mediar a passagem do fluido seminal. Foram demonstrados receptores muscarínicos no pênis e na musculatura lisa do pênis e da uretral do rato (Godec & Bates, 1984). A emissão do sêmen na uretra depende da inervação simpática, que condiciona a contração da musculatura lisa do canal deferente, da vesícula seminal e da próstata (Bruschini et al., 1977; McConnell et al., 1979). Nervos parassimpáticos também estimulam a secreção da vesícula seminal e da próstata (de Groat & Booth, 1980). Parece que a pilocarpina através da estimulação de receptores muscarínicos pode ativar a síntese de NO do endotélio do vasos bem como dos nervos NANC. Além disso, pode haver um sinergismo com o NO na modulação da atividade secretória e do tônus muscular dos órgãos genitais.

O principal objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da inibição crônica da síntese de óxido nítrico no comportamento sexual e na fertilidade de ratos machos adultos. Os resultados demonstraram que a administração oral de L-NAME (40 mg/kg/dia durante um ciclo espermato gênico completo) exerce um efeito inibitório no comportamento sexual masculino, bloqueia a espermato gênese, aumentando o número de alterações morfológicas nos espermato zóides e diminui a fertilidade em ratos. Esta dose de L-NAME foi escolhida com base em dados da literatura (Yallampalli & Garfield, 1993; Hull et al., 1994). As alterações induzidas com a dose que utilizamos consistem no aumento da latência da primeira monta e da intromissão e a marcada inibição da frequência de intromissão e de ejaculação. Essas observações são consistentes com o efeito inibitório estabelecido do L-NAME sobre o relaxamento dos corpos cavernosos, levando a disfunção erétil (Ignarro, 1992; Burnett et al., 1992; Hull et al., 1994) e sobre a emissão seminal e ejaculação induzida por estimulação colinérgica (Tomé et al., 1999). Esse impedimento parece refletir primariamente a inibição da função erétil, embora este parâmetro não tenha sido avaliado no presente experimento. O mecanismo molecular da ereção peniana envolve o relaxamento da musculatura lisa (arteriolar e trabecular), que é na verdade uma mudança no tônus contrátil através da reposição do estado pré-contrátil (adrenérgico) acompanhado por diminuição do Ca^{2+} e/ou pela diminuição da sensibilidade do maquinário contrátil ao Ca^{2+} . A redução na concentração do Ca^{2+} citosólico é promovida pelo AMPc, GMPc ou por ativação dos canais de potássio com hiperpolarização, que previne a abertura dos canais de cálcio

voltagem dependentes. A guanilato ciclase, que cataliza a conversão da guanosina trifosfato para GMPc é ativada pelo NO (Snyder, 1992). O GMPc ativa a proteínaquinase G, que através de múltiplas fosforilações facilita o seqüestro do cálcio e reduz a entrada do mesmo para a célula (De Tejada, 2002). Assim, a inibição da síntese de NO pelo L-NAME pode adversamente afetar a ereção peniana e acentuar a influência do tônus contrátil adrenérgico levando a uma disfunção erétil. Além disso, foi comunicado recentemente, que o L-NAME induz deficiência somática motora (Araki et al., 2001), que pode também contribuir para dificultar a monta e a intromissão. A taxa de cobertura deve ser relacionada à motivação sexual, enquanto a frequência é reconhecida como parâmetro útil da potencialidade erétil masculina ou de sensibilidade peniana (Miesel et al., 1994). A reduzida receptividade de fêmeas aos machos também pode afetar a taxa de cobertura. A receptibilidade das ratas foi demonstrada antes do teste de comportamento sexual e apenas animais receptivos foram utilizados para o mesmo.

O testículo tem duas funções; síntese de hormônios esteroidais e espermatogênese. Esses processos ocorrem em estruturas anatomicamente distintas. A função endócrina é desempenhada por células embutidas entre os túbulos seminíferos, enquanto a espermatogênese, processo de produção de espermatozóides, ocorre dentro dos túbulos. Em resposta a estimulação do hormônio luteinizante (LH), proveniente da adeno hipófise, as células de Leydig presentes no testículo são responsáveis pela produção de testosterona.

Uma das mais críticas influências que a inibição de NOS pode ter no

sistema reprodutivo é a indução da diminuição da secreção de testosterona. A administração diária de 40 mg/Kg de L-NAME durante oito semanas causou uma diminuição significativa da concentração sérica de testosterona nos animais utilizados nesse estudo. Foi demonstrado, que a remoção de testosterona induzida pela destruição das células de Leydig, interrompe o processo espermatogênico (Sharpe et al., 1990). Esta influência parece ser focalizada no estágio VII do epitélio seminífero, que ocorre imediatamente antes da espermiogênese e afeta principalmente o espermatócito I, na etapa de paquíteno, a espermátide arredondada e a espermátide em alongamento. Uma marcada degeneração dos dois primeiros tipos celulares poderia resultar em um declínio do número de espermatozóides e a desintegração do último tipo celular poderia potencialmente estar associado a problemas no desenvolvimento de estruturas especializadas do espermatozóide, como o acrossoma ou a cauda. Curiosamente, em nosso estudo, observamos tanto uma diminuição do número de espermatozóides como aumento de anormalidades morfológicas após o tratamento com L-NAME e a microscopia eletrônica revelou defeitos acrossômicos. A atividade secretória normal do epitélio epididimário e de outros órgãos sexuais acessórios depende do nível plasmático de andrógenos, os quais estão sob controle do FSH e o LH (Mann & Ludwak-Mann, 1981). Durante o trânsito normal através do epidídimo, o espermatozóide desenvolve gradualmente a capacidade para fertilizar o óvulo sob a influência de suprimento androgênico proveniente dos testículos (Ogebin-Crist & Jahad, 1978; Moore & Bedford, 1979). A discreta ruptura do epitélio observada na periferia dos túbulos seminíferos de ratos machos tratados com

L-NAME, pode ser uma consequência da diminuição do fluxo sanguíneo para os testículos, devido ao fato da inibição crônica da NOS induzir hipertensão e reduzir o fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular (Gabbai, 2001).

Uma segunda consequência da diminuição dos níveis de testosterona poderia ser uma influência adversa sobre o comportamento sexual. A presença de testosterona é necessária para a liberação de dopamina na MPOA durante condições basais e após estímulo sexual. Os níveis de dopamina nesta área reflete ativação motora primária, além de aspectos de motivação de comportamento de cópula (Damasma et al., 1992), que é influenciado pelo sistema mesolímbico (Everitt et al., 1989). Uma maneira pela qual a testosterona pode promover liberação de dopamina é através da regulação crescente de NOS, que por sua vez, por ação do NO, aumenta a liberação de dopamina (Hull et al., 1997). Microinjeções de inibidores de NOS na MPOA inibe a habilidade de machos vírgens de copularem (Moses & Hull, 1999). Além do mais, a administração de L-arginina por meio de microdiálise reversa na MPOA aumenta a taxa de cobertura (Sato et al., 1998). Assim, parece que o bloqueio parcial da secreção de testosterona acompanha as mudanças induzidas pelo L-NAME na taxa de cobertura e na frequência de intromissão. Contudo, os dados publicados a respeito dos níveis de testosterona *in vitro* e *in vivo* em resposta a tratamento com doadores de NO e inibidores da NO sintetase, sobre os níveis de testosterona são confusos. Nesses estudos, ratos machos tratados com doadores de NO ou com inibidores da NOS mostraram um aumento significativo da testosterona sérica, e do fluido intersticial, bem como um aumento quando os animais foram

tratados com inibidores de NOS em estudo feito com fatias testiculares *in vitro*. Enquanto Adams et al.(1994) comunicavam efeito não significativo do doador de NO dinitrato de isosorbide sobre a esteroidogênese testicular, Del Punta et al. (1996) demonstraram um efeito inibitório de doadores de NO neste processo. A razão para esta discrepância entre esses e os nossos resultados pode provavelmente ser atribuída ao tipo de doador de NO/ou inibidor de NOS utilizado e/ou a dosagem utilizada. A dose de L-NAME utilizada em nossos protocolos experimentais não acarretou qualquer alteração no peso corporal ou no peso relativo dos testículos, vesícula seminal e próstata.

Diversos estudos sugerem que as células testiculares são bem equipadas com a via NO-GMPc, que pode participar na regulação da função testicular, como a espermatogênese e esteroidogênese (Davidhoff et al., 1995; Zini et al., 1996; Tatsumi et al., 1997; Wang et al., 1997). A esteroidogênese nas células de Leydig há muito tempo tem sido reconhecida como estando sob o controle do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular. Burnett et al. (1995) demonstraram a capacidade do testículo em sintetizar NO através de vários tipos celulares. Técnicas de imunohistoquímica e avaliação de RNAm estabeleceram, que a NOSi é expressa constitutivamente nas células de Leydig e de maneira específica nas células de Sertoli, nas células peritubulares e nas células espermatogênicas de testículos normais (O'Bryan et al., 2000), sugerindo um novo papel para a NOSi na regulação autócrina ou parácrina da vasculatura testicular, na esteroidogênese nas células de Leydig e na espermatogênese. Outras células produtoras de NO, principalmente as células endoteliais, mastócitos e macrófagos são

observadas numa associação íntima com as células de Leydig e foram descritas como moduladoras da biossíntese de testosterona (Hutson, 1992; Burnett et al., 1995). Tornou-se difícil neste estudo, precisar se o L-NAME diminuiu a produção de testosterona por efeito direto no testículo ou se através da inibição da liberação de LHRH e LH. Alguns estudos têm demonstrado, que o L-NAME inibe a liberação de LHRH e de LH (Rettori et al., 1993; Pinilla et al., 1999), que são necessários para a estimulação das células de Leydig para produção de andrógenos (Soez, 1994). A habilidade dos ratos tratados com L-NAME em acasalar foi mantida apesar do baixo nível sérico de testosterona, que foi suficiente para o comportamento de cobertura normal, porém foi insuficiente para a manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide epididimário.

O papel do NO na modulação do processo reprodutivo em fêmeas tem sido estudado com maior intensidade. Por exemplo, o papel do NO no processo de ovulação, implantação e gestação foi bem estabelecido (Rosselli et al., 1998; Dixit & Parvizi, 2001). Biswas et al. (1998) demonstraram, que a inibição da NOS pelo L-NAME acarreta um retardo no crescimento embrionário e falha no processo de implantação, o que pode ser atenuado pelo nitroprussiato de sódio ou por outro doador de NO. A redução crônica da produção de NO pelo L-NAME no terço final da gestação (entre os dias 13 e 20 na dose de 0,1 a 6 mg/ml na água de beber, que resulta em aproximadamente em 6 a 60 mg/dia) demonstrou a indução de uma redução significativa do crescimento intrauterino dos fetos, além de processo necrótico hemorrágico em ratas (Diket et al., 1994). Este efeito do L-NAME foi prevenido pela co-administração do nitroprussiato de sódio,

sugerindo que o desenvolvimento fetal é mediado pelo NO. Por outro lado, poucos estudos foram direcionados no intuito de conhecer o efeito da inibição do NO na reprodução de ratos machos. O efeito sobre os parâmetros reprodutivos em animais normalmente começa com o reconhecimento do surgimento de por exemplo diminuição da produção espermática, impotência e infertilidade. O efeito da L-arginina, o substrato para a síntese de NO, sobre a função reprodutiva de ratos machos tem sido recentemente examinado. Os resultados mostraram que o tratamento com L-arginina (200mg/kg/dia , v.o. por um período de 7 dias consecutivos), efetiva e reversivelmente inibiu a fertilidade em ratos machos (Ratnassoriya & Dharmasiri, 2001), indicando que a produção elevada de NO pode ser em detrimento da fertilidade masculina. Contudo, não existem estudos que tenham avaliado os efeitos de inibidores da NOS na fertilidade masculina.

A influencia adversa do L-NAME na função testicular, na contagem espermática epididimária e nas anormalidades observadas neste estudo indicam fortemente, que este é capaz de diminuir a fertilidade de machos mamíferos. Portanto, foram analisados os efeitos da inibição da NOS na fertilidade de ratos machos adultos. A administração diária de L-NAME (40mg/kg/dia, i.p., durante um ciclo espermatogênico) resultou no impedimento da fertilidade. O L-NAME suprimiu significativamente a fertilidade tanto quando foi feita a mensuração do número de implantações quanto de gestação, quando comparado ao grupo controle tratado com salina, o que é indicativo de algum tipo de interrupção da função espermática como o transporte do espermatozóide na fêmea, capacitação, reação acrossômica penetração na zona pelúcida ou fusão do espermatozóide

com o óvulo (Wassarman, 1987). Com vistas a isso, tem sido mostrado que a inibição da NOS durante a capacitação espermática impede a fertilidade “*in vitro*” e a reação acrossômica espontânea em camundongos (Herrero et al., 1997). O número de fêmeas acasaladas com machos receberam tratamento com L-NAME foi altamente reduzido, resultando numa inibição de 75% da fertilidade. O efeito inibitório do L-NAME em ratos machos pode ser atribuído a inibição da NOS, que suprime a integridade funcional testicular e/ou epididimária, possivelmente inibindo a secreção de andrógeno local e/ou de gonadotrofina. A privação de andrógeno, não somente suprime a espermatogênese, levando a uma baixa concentração espermática, mas também altera o meio epididimário, que torna-se inadequado à maturação e sobrevivência do espermatozóide (Setty, 1979; Rao & Mathur, 1988; Rao & Shah, 1988). A concentração e morfologia espermática no epidídimo foi, entretanto, adversamente afetada após a administração do L-NAME. Uma concentração inadequada de espermatozoides não pode penetrar o muco cervical, levando a uma falha na fertilização do óvulo. O presente estudo demonstrou, que a inibição da NOS pode impedir a fertilização em ratos devido a interferência nos níveis de andrógenos testiculares.

O estudo através da microscopia ótica e eletrônica demonstrou alterações morfológicas. Dentre as alterações encontradas na avaliação através da microscopia eletrônica, o rareamento das cristas mitocondriais presentes nas células de Leydig pode estar relacionada as alterações da concentração sérica da testosterona, tendo em vista que o metabolismo do colesterol tem etapa mitocondrial. Além disso, o comprometimento da integridade mitocondrial

afeta a cadeia respiratória celular podendo corroborar para a geração de espécies reativas de oxigênio podendo acarretar citotoxicidade. Uma grande quantidade de vacúolos, estruturas compatíveis com processo degenerativo celular, foi encontrada na porção periférica do parênquima testicular, quando da avaliação através de microscopia ótica e mais detalhadamente nas células de Leydig e Sertoli, através da microscopia eletrônica.

Em síntese, os resultados obtidos neste estudo oferecem evidências, de que o NO age como um importante mediador dos processos reprodutivos masculinos tais como descida testicular, comportamento sexual e fertilidade. Estudos futuros podem corroborar na avaliação do uso de moduladores da síntese de NO para o tratamento de distúrbios reprodutivos específicos tais como impotência e infertilidade masculina.

6. CONCLUSÕES

6.1 O óxido tem papel modulatório na descida testicular

6.2 O óxido nítrico medeia a neurotransmissão inibitória responsável pela estimulação colinérgica associada a emissão seminal

6.3 A inibição da óxido nítrico sintetase durante um ciclo espermatogênico suprimiu a função testicular resultando na diminuição da secreção de andrógenos e comprometeu a espermatogênese.

6.4 A inibição da óxido nítrico sintetase prejudicou a fertilização em ratos machos, fato este, atribuído principalmente as disfunções testiculares.

Os dados obtidos sugerem, que o óxido nítrico é uma molécula mensageira importante nos processos reprodutivos de machos. Desta forma, moduladores da óxido nítrico sintetase podem ser vistos como ferramentas potenciais para o tratamento da impotência e da infertilidade masculina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-SOUD, H. M.; FELDMAN, P. L. et al. Electron transfer in nitric oxide syntheses: characterization of L-arginina analogs that block heme iron reduction. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 32318-32326, 1994.
- ADAMS, ML., MEYER, ER., SEWING, BN., CICERO, TJ. 1994. Effects of nitric oxide related agents on rat testicular function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 230-237.
- ALI, M.; BUHIMISCHI, I. et al. Changes in expression of nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 3, p. 995-1003, 1997.
- ARAKI, T., MIZUTANI, H., MATSUBARA, M., IMAI, Y., MIZUGAKI, M., ITOYAMA, Y. 2001. Nitric oxide synthase inhibitors cause motor deficits in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 11: 125-133.
- AZUMA, H.; OBAYASHI, S. et al. Role of endothelium in human uterine arteries during normal menstrual cycle. *Br. J. Pharmacol.*, v. 114, p. 902-908, 1995.
- BAZZETT, TJ., EATON, RC., THOMPSON, JT., MARKOWSKI, VP., LUMELY, LA., HULL, EM. 1991. Dose-dependent D2 effects on genital reflexes after MPOA injections of quinolorane and apomorphine. *Life Sci.* 48: 2309-2315.
- BECKMAN, J.S.; BECKMAN, T. W. et al. Apparent hydroxyl radical production of peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BECKMAN, J.S; CROW, J. P. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 21, p. 330-334, 1993.
- BENASSI-BENELLI, A., FERRARI, F., PELLEGRINI QUARRANTOTTI, B. 1979. Penile erection induced by apomorphine and N-n-propyl-norapomorphine in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 242: 241-247.
- BENSON, GS. 1988. Male sexual function: erection, emission, reproduction.

Raven Press, New York, pp. 1121-1139.

BISWAS, S., KABIR, SN., PAL, AK. 1998. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J. Reprod. Fert.* 114: 157-161.

BITRAN, D., HULL, M. 1987. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 11: 365-389.

BOGLE, R.G. et al. Induction of N^G Monomethyl-L-arginine (L-NNMA) uptake by human endothelial cells and activated murine macrophages: a possible mechanism for differential inhibition of nitric oxide biosynthesis. *Am. J. Physiol.*, v. 269, p. C750-C752, 1995.

BOGLE, R.G.; BAYDOUN, A. R. et al. L-Arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem. J.*, v. 284, p.15-18, 1992.

BONELLO, N.; MCKIE, K. et al. Inhibition of nitric oxide effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormone and ovarian leukocyte distribution at ovulation in rat. *Biol. Reprod.*, v. 54, p. 436-445, 1996.

BREDT, D.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 8, p. 682-685, 1990.

BREDT, D.; SNYDER, S. H. Nitric oxide: a physiology messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 63, p. 175-195, 1994.

BREDT, D.S.; FERRIS, C. D. et al. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C and calcium/calmodulin protein kinase, identification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 10976-10981, 1992.

BRUSCHINI, H., SCHMIDT, RA., TANAGHO, EA. 1977. Studies on neurophysiology of vas deferens. *Invest. Urol.* 15: 112-116.

BUHIMISCHI, I.; ALI, M. et al. Differential regulation of nitric oxide in rat uterus and cervix during pregnancy and labor. *Hum. Reprod.*, v. 11, p. 1755-1766, 1996.

BURNETT, A. L.; LOWENSTEIN, C. J. et al. Nitric oxide: a physiological mediator of penile erection. *Science*, v. 257, p. 410-413, 1992.

BURNETT, A. L.; NELSON, R. J. et al. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking nitric oxide synthase. *Mol. Med.*, v. 2, p. 288-290, 1996.

BURNETT, A. L.; RICKER, D. D. et al. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of male rat. *Biol. Reprod.*, v. 52, p. 1-7, 1995.

BURNETT, A. L.; TILLMAN, S. I. et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in anatomic innervation of the human penis. *J. Urol.*, v.150, p. 73-76, 1993.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 8410-8413, 1993.

CARRIER, S.; NAGARAJU, P. et al. Age decrease nitric oxide synthase-containing nerve fibres in the rat. *J. Urol.*, v. 157, p. 1088-1092, 1997.

CHAMPION, H.C.; WANG, R. et al. Adrenomedullin induces penile erection in the cat. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 319, p.71-75, 1997.

CHANG, J. Y.; HUANG, C. L. et al. Nitric oxide as a mediator of cocaine-induced penile erection in rat. *Br. J. Pharmacol.*, v. 118, p. 155-161, 1996.

CHARLES, I.G.; PALMER, R. M. J. et al. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 11419-11423, 1993.

CHATTERJEE, S.; GANDULA, P. R. et al. Immunocytochemical localization of nitric oxide-II in reproductive organs of female rats during the oestrous cycle. *Histochem.*, v. 28, p. 715-723, 1996.

CHO, H. J.; XIE, Q. et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.*, v. 176, p. 599-604, 1992.

COOK, J. P.; TSAO, P. S. Cytoprotective effects of nitric oxide. *Circulation*, v. 88, p. 2451-2454, 1993.

CORBETT, J. A. et al. Aminoguanidine a novel inhibitor of nitric oxide formation prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*, v. 41, p. 552-556, 1992.

DAMASMA, G.; PFAUS, J. G. et al. Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behav. Neurosci.*, v. 106, p. 181-191, 1992.

DAVIDOFF, M. S.; MIDDENDORFF, R. et al. Nitric oxide synthase (NOS-

- 1) in Leydig cells of human testis. Arch. Histol. Cytol., v. 58, p.17-30, 1995.
- DAVIES, M. G.; FULTON, G. J. et al. Clinical biology of nitric oxide. Br. J. Surg., v. 82, p. 1598-1610, 1995.
- DE GROAT, W. C.; BOOTH, A. M. Physiology of male sexual function. Ann. Intern. Med., v. 92, p. 329-340, 1980.
- DEL PUNTA, K.; CHARREAU, E. H. et al. Nitric oxide inhibits Leydig cell steroidogenesis. 137: 5337-5343, 1996.
- DIKET, AL., PIERCE, MR., MUNSHI, UK., VOELKER, CA., SANDRA ELOBY-CHILDRESS, BS., GREENBERG, SS. 1994. Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruptions in rats. Am. J. Obstet. Gynecol. 171: 1243-1250.
- DINERMAN, J. L.; LOWENSTEIN, L. J. et al. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation: potential relevance to cardiovascular disease. Circ. Res., v. 73, p. 217-222, 1993.
- DONG, Y. L.; YALLAMPALLI, C. Interaction between nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in pregnant rat uteri. Am. J. Physiol., v. 270, p. E471-E476, 1996.
- EKERHOVD, E. BRAENNTROEM, M. et al. Evidenc for nitric oxide medieted contractile activity in isolated strips of human Fallopian tube. Hum. Reprod., v. 12, p. 301-305, 1997.
- EVERITT, BJ., CADOR, M., et al. Interactions between the amygdala and ventral stiatum in stimulus-reward associations: studies using a second-order schedule of sexual reinforcement. Neuroscience. 30: 63-75, 1989.
- FARIA, MS., MUSCARÁ, MN. et al. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. Eur. J. Pharmacol. 323: 37-43. 1997
- FURCHGOTT, R.F. Introduction to EDRF research. J. Cardiovasc. Pharmacol. v.22, [suppl 7], p. 51-2, 1993.
- GABBAI, FB. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. Nephrol. Dial. Transplant. v.16, [Suppl 1], p.10-13, 2001.
- GARBAN, H.; MARQUEZ, D. et al. Restoration of normal adult penile erection response in aged rats by-long term treatment with androgens. Biol. Reprod.,

v. 53, 1365-1372, 1995.

GARBAN, H.; MARQUEZ, D. et al. Cloning of rat and human inducible penile nitric oxide synthase: application for gene therapy of erectile dysfunction. *Biol. Reprod.*, v. 56, p. 954-963, 1997.

GARTHWAITE, J.; CHARLES, S. L. et al. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, v. 336, p. 385-388, 1988.

GELLER, D. A.; LOWENSTEIN, C. J. et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 3491-3495, 1993.

GODEC, C.J., BATES, H. 1984. Cholinergic receptors in corpora cavernosa. *Urology*. 24: 31-33.

GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthase properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 707-736, 1995.

GROSH, D. A.; ABU-SOUD, H.M. et al. Domain of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry*, v. 35, p. 1444-1449, 1996.

HAMILTON, MO., PAPKA, RE., O'DONOGHUE, DL., VAIDYA, AM., WILLIAMS, SJ., POFF, CR., MCCNEILL, DL. 1995. Spinal projection neurons to the laterodorsal pontine tegmental nucleus: relationship to preganglionic neurons and nitric oxide synthase. *J. Comp. Neurol.* 355: 1-8.

HAYSHIDA, H.; OKAMURA, T. et al. Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum. *J. Urol.*, v.155, p. 1122-1127, 1996.

HEINZEL, B.; JOHN, M. et al. Ca^{2+} /calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.*, v. 281, p. 627-630, 1992.

HERRERO, MB., GOIN, JC., BOQUET, M., CANTEROS, MG., FRANCHI, AM., MARTINEZ, SP., POLAK, JM., VIGGIANO, JM., GIMENO, MAF. 1997. The nitric oxide synthase of mouse spermatozoa. *FEBS Letters*. 411: 39-42.

HIBBS, J. B.; TAINTOV, R. R. et al. Macrophage cytotoxicity: role for L-

arginine deaminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, v. 235, p. 473-476, 1987.

HOLMQUIST, F.; STIEF, C. G. et al. Effects of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine on erectile response to cavernous nerve stimulation in rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, v. 143, p. 299-304, 1991.

HOLMQUIST, F.; STIEF, C.G. et al. Effect of the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine on erectile response to cavernous nerve stimulation in rabbit. *Acta Physiol. Scand.*, v. 143, p. 299-304, 1991.

HUANG, P. L. et al. Hypertension in mice lacking the gene for the endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, v. 377, p. 239-242, 1995.

HULL, EM., DU, J., LORRAIN, DS., MATUSZEWICH, L. 1997. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain. Res. Bull.* 44: 327-333.

HULL, EM., EATON, RC., MARKOWSKI, VP., MOSES, J., LUMELY, LA., LOUCKS, JA. 1992. Opposite influence of medial preoptic D₁ and D₂ receptors on genital reflexes: implications for copulation. *Life. Sci.* 51: 1705-1713.

HULL, EM., LUMLEY, LA., MATUSZEWICH, L., DOMINGUEZ, J., MOSES, J. LORRAIN, DS. 1994. The roles of nitric oxide in sexual function of male rats. *Neuropharmacology.* 33: 1499-1504.

HUTSON, JM. 1985. A biphasic model for the hormonal control of testicular descent. *Lancet.* 24: 419-421.

HUTSON, JM. 1992. Development of interdigitations between Leydig cells and macrophages. *Cell. Tiss. Res.* 267: 385-389.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L. J.; BUSH, P. A. et al. Nitric oxide and cyclic GPM formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 170, p. 843-850, 1990.

Ignarro, LJ. 1992. Nitric oxide as the physiological mediator of penile erection. *J. NIH Res.* 4: 59-62.

JAFFREY, R. S.; SNYDER, S. H. PIN- an associated protein inhibitor of

- neuronal oxide synthase. *Science*, v. 274, p. 774-777, 1996.
- KEANEY, J.F.; SIMON, D. I. et al. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor like properties. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p. 1582-1589, 1993.
- KELLY, R. A., BALLIGAND, J. L. et al. Nitric oxide and cardiac function. *Circ. Res.*, v. 79, p. 363-380, 1996.
- KIM, N.; VARDI, Y. et al. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. *J. Clin. Invest.*, v. 91, p. 437-442, 1993.
- KLATT, P.; SCHMIDT, K. et al. Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of sds-resistant dimer. *EMBO J.*, v. 14, p. 3687-3695, 1995.
- LANCASTER, J. R.; LANGREHR, J. M. et al. EPR detection of heme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 10994-10998, 1992.
- LARSSON, K., AHLENIUS, S. 1999. Brain and sexual behaviour. *Ann. NY. Acad. Sci.* 877: 292-308.
- LEVY, JB., HUSMANN, DA. 1995. The hormonal control of testicular descent. *J. Androl.* 16: 459-463.
- LIM, HN., HUGHES, IA., HAWKINS, JR. 2001. Clinical and molecular evidence for the role of androgens and WT1 in testis descent. *Mol. Cell. Endocrinol.* 185: 43-50.
- LUGG, J. A.; RAJFER, J. et al. Dihydrotestosterone is active androgen in the maintenance of nitric oxide-mediated penile erection in the rat. *Endocrinology*, v. 136, p. 1495-1501, 1995.
- MAGGE, T.; FUENTES, A. M. et al. Cloning a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in penis and lower urinary tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 226, p. 145-151, 1996.
- MAGNESS, R. R.; ROSENFELD, C. R. et al. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. Effects of AngII on PGI₂ and NO in pregnancy. *Am. J. Physiol.*, v. 270, p. H1914-H1923, 1996.
- MANN, T., LUTWACK-MANN, C. 1981. Male reproductive function and

semen. In, Theures and Trends in Psychology, Structure and Investigative Urology, T. Kaun (Ed), pp140-149, Springer, New York.

MATTSON, D. L. et al. Inducible nitric oxide synthase and blood pressure. Hypertension, v. 31, p. 15-20, 1998.

MCALISTER, R.J. et al. Regulation of nitric oxide synthase by dimethyl-arginine dimethylaminohydrolase. Br. J. Pharmacol., v. 119, p. 1533-1540, 1996.

MCALISTER, R.J.; VALLANCE, P. Endogenous inhibition of nitric oxide synthase. How important are they? Exp. Nephrol., v. 6, p. 195-199, 1998.

McConnell, J., Benson, GS., Wood, J. 1979. Autonomic innervation of the mammalian penis: a histochemical and physiological study. J. Neurol. Transm. 45: 227-238.

MCDONALD, L. J.; MOSS, J. Stimulation by nitric oxide of an NDA linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 90, p. 6238-6241, 1993.

MEISEL, RL., O'HANLON, JK., SACHS, BD. 1994. The Physiology of male sexual behaviour. In: Knobil, E., Neill, J. (Eds), the Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, pp.3-105.

MELIS, M. R. ; STANCAMPIANO, R. et al. Nitric oxide synthase inhibitors prevent N-methyl-D-aspartic acid-induced penile erection and yawning in male rat. Neurosci. Lett., v. 179, p. 9-12, 1994 a.

MELIS, M. R.; STANCAMPIANO, R. et al. Prevention by NG-nitro-L-arginine methyl ester of apomorphine and oxytocin-induced penile erection and yawning: site of action in the brain. Pharmacol. Biochem. Behav., v. 48, p. 799-804, 1994b.

MELIS, M. R.; SUCCU, S. et al. Dopamine agonist increase nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: correlation with penile erection and yawning. Eur. J. Neurosci., v. 10, p. 2056-2063, 1996.

MICHEL, T.; LI, G. K. et al. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 90, p. 6252-6256, 1993.

MICHELL, H. H.; SHONLE, J.S. et al. The origin of the nitrites in urine. J. Biol.

Chem., v. 24, p. 461-490, 1916.

MISKO, T. P. et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 233, p. 119-125, 1993.

MOHR, S.; STAMLER, J. S. et al. Post translational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 4209-4214, 1996.

MONCADA, S., PALMER, RM., HIGGS, EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac. Rev.* 43: 109-142.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J. et al. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Ver.*, v. 43, p. 109-142., 1991.

MOORE, HDM., BEDFORD, JM. 1979. The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. *Anat. Rec.* 103: 313-315.

MOORE, P. K. et al. L-NG-nitroarginine (L-NOARG), a novel L-arginine reservible inhibition of endothelium-dependent vasodilation in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, v. 99, p. 408-412, 1990.

MORONDE, E.; MIDDENDORFF, R. et al. The effect of NO-donors and rat pineal cells: stimulation of cGMP-independent inhibition of melatonin synthesis. *J. Neuroendocrinol.* v.7, p. 202-214, 1995.

MORRIS, S. M.; BILLIAR, T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.*, v. 266, p. E829- E839, 1994.

MULSCH, A.; MORDVINTCEV, P.I. et al. Formation and release of dinitrosyl iron complexes by endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 196, p. 1303-1308, 1993.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv. Pharmacol.*, v. 26, p. 19-33, 1994.

MURRAD(1977)

NATHAN, A. K.; XIE, Q. W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* v. 269, p.13275-13278, 1994.

NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T. R. et al. Conduction of nitric oxide synthase and arginosuccinate synthase in a murine macrophage cell line. Implications for

regulation of nitric oxide production. *J. Biol. Chem.*, v. 269, p. 1257-1261, 1994.

NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T. R. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukocyte Biol.*, v. 54, p. 171-178, 1993.

O'BRYAN, MK., SCHLATT, S., GERDPRASERT, O., PHILLIPS, DJ., DE KRETZER, DM., HEDGER, MP. 2000. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. *Biol. Reprod.* 63: 1285-1293.

ORGBIN-CHRIST, MC., JAHAD, N. 1978. The maturation of rabbit epididymis spermatozoa in organ culture: inhibition by antiandrogens and inhibitors of ribonucleic acid and protein synthesis. *Endocrinology*. 103: 46-49.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S. et al. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v. 33, p. 664-668, 1988.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G. et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxation factor. *Nature*, v. 327, p. 524-526, 1987.

PENSON, D. F.; NG, C. et al. Androgen and pituitary control penile nitric oxide synthase and erectile function in rat. *Biol. Reprod.*, v.55, p.567-574, 1996.

PERSSON, K., ALM, P., UVELIUS, B., ANDERSSON, KE. 1998. Nitrgic and cholinergic innervation of the rat lower urinary tract after pelvic ganglionectomy. *Am. J. Physiol.* 274: R389-R397.

PINILLA, L., TENA-SEMPERE, M., GONZALEZ, D., ANGUIAR, E. 1999. The role of nitric oxide in the control of basal and LHRH-stimulated LH secretion. *J. Endocrinol. Invest.* 22: 340-348.

PINTO, A. R. Papel da óxido nítrico sintetase e cicloxigenase 1 e 2 no escape vascular sistêmico em ratos normotensos. Tese de Mestrado. Dep. de Fisiologia e Farmacologia, UFC, Brasil, 1999.

RAJFER, J., WALSH, PC. 1977. Hormonal regulation of testicular descent: experimental and clinical observations. *J. Urol.* 118: 985-990.

RAO, MV., MATHUR, N. 1988. Estrogen-induced effects on mouse testis and epididymal spermatozoa. *Exp. Clin. Endocrinol.* 92: 231-234.

RAO, MV., SHAH, KD. 1988. Endocrine approach to male fertility control

by steroid hormone combination in rat *Rattus norvegicus* L. Ind. J. Exp. Biol. 36: 775-779.

RATNASOORIYA, WD., DHARMASIRI, MG. 2001. L-arginine, the substrate of nitric oxide synthase, inhibits fertility of male rats. Asian J. Androl. 3: 97-103.

REGAZZI, E.; CHINELLATO, A. et al. Characterization of in vitro relaxant mechanism in erectile tissue from rabbits of different ages. Urol. Res., v. 24, p. 317-322, 1996.

RETTORI, V., BELOVA, N., DEES, WL., NYBERG, CL., GIMERO, M., MCCAUN, SM. 1993. Role of nitric oxide in the control of leutinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 10130-10134.

RIEMAN, R.K.; BUSCHER, C. et al. Increases expression of nitric oxide synthase in the myometrium of pregnant rat uterus. Am. J. Physiol., v. 272, p. E1008-E1015, 1997.

ROSELLI, M., KELLER, PJ., DUBEY, RK. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Human Reproduction Update. 4: 3-24.

ROSELLI, M.; KELLER, P.J. et al. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Human Reproduction Update, v. 4, p. 3-24, 1998.

ROSELLI, M.; IMTHURN, B. et al. Circulating nitrite/nitrate increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated release. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 202, p. 1543-1552, 1994 a.

ROSELLI, M.; IMTHURN, B. et al. Endogenous nitric oxide modulates endothelin-1 induced contraction in bovine oviduct. Biochem. Biophys. Commun., v. 201, p. 143-148, 1994b.

SATO, Y., HORITA, H., KUHOHATA, T., ADACHI, H., TSUKAMOTO, T. 1998. Effect of nitric oxide level in the medial preoptic area on male copulatory behaviour in rats. Am. J. Physiol. 274: R243-R247.

SAX, H. C.; HASSELGREN, P. O. et al. Amino acid uptake in isolated liver: effect of trauma and sepsis. J. Surg. Res., v. 45, p. 50-55, 1988.

- SESSA, W. C. The nitric oxide synthase family of proteins. *J. Vasc. Res.*, v.31, p. 131-143, 1994.
- SETTY, BS. 1979. Regulation of epididymal function and sperm maturation-endocrine approach to fertility control in male. *Endocrinology*. 74: 100-117.
- SHARPE, RM., MADDOCKS, S., KERR, JB. 1990. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *Am. J. Anat.* 188: 3-20.
- SHESELEY, E. G. et al. Elevated blood pressure in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 13176-13181, 1996.
- SIDDHANTA, U.; WU, C. et al. Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reduction and two oxygenase domains. *J. Biol. Chem.*, v. 271, p. 7309-7312, 1994.
- SNYDER, S. H. Nitric oxide: NO endothelial NO. *Nature*, v. 377, p. 196-197, 1995.
- SNYDER, S. H.; BREDET, D. (1989)
- SOEZ, JM. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Endocr. Rev.* 15: 574-626.
- SPENCER, JR., VAUGHAN EDJR., IMPERATO-MCGINLEY, J. 1993. Studies of the hormonal control of postnatal testicular descent in the rat. *J. Urol.* 149: 618-623.
- STIEF, C., BENARD, F., BOSCH, R., ABOSEIF, S., NUNES, L., LUE, TF., TANAGHO, EA. 1989. Acetylcholine as a possible neurotransmitter in penile erection. *J. Urol.* 141: 1444-1448.
- STIEF, C.G.; HOLMQUIST, F. et al. Preliminary results with the nitric oxide donor linsidomine chlorhydrate in the treatment of human erectile dysfunction. *J. Urol.*, v. 148, p. 1437-1440, 1992.
- STUEHR, D. J. et al. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneidonium and its analogs. *FASEB J.*, v. 5, p. 98-103, 1991.
- SU, Z.; BLAZING, M. A. et al. The calmodulin-nitric oxide synthase interaction: critical role of calmodulin latch domain in enzyme activation. *J. Biol. Chem.*,

v. 270, p. 29117-29122, 1995.

TANNENBAUM, S. R., Moran

TANNENBAUM, S. R.; FETT, D. et al. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science*, v. 200, p.1487-1489, 1928.

TATSUMI, N., FIJISAWA, M., KANZAKI, M. et al. 1997. Nitric oxide production by cultured rat Leydig cells. *Endocrinology*. 138: 994-998.

TELFER, J.; LYALL, F. et al. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. *Hum. Reprod.*, v.10, p. 19-23, 1995.

TOMÉ, AR., DA SILVA, JCR., SOUZA, AAA., MATTOS, JPV., VALE, MR., RAO, VSN. 1999. Possible involvement of nitric oxide in pilocarpine induced seminal emission in rats. *Gen. Pharmacol.* 33: 479-485.

TZENG, E.; BILLIAR, T. R. et al. Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line: H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,v.92, p.11771-11775, 1995.

VALLANCE, P. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in chronic renal failure. *Lancet*, v.339, p. 572-575, 1992.

VANHATALO, S.; KLINGE, E. et al. Nitric oxide-synthesizing neurons originating at several different levels innervate rat penis. *Neuroscience*, v.75, p. 891-899, 1996.

VANHATALO, S.; SOINILA, S. Direct nitric oxide-containing innervation from rat spinal cord to the penis. *Neurosci. Lett.*, v. 199, p. 45-48, 1995.

VEILLE, J. C.; LI, P. et al. Effects of estrogen on nitric oxide biosynthesis and vasorelaxant activity in sheep uterine and renal arteries in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.174, p. 1043-1049, 1996.

VERNET, D.; CAI, L. et al. Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetes BB/WORdp (type I) and BBZ/WORdp (TypeII) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology*, v. 136, p. 5709-5717, 1995.

VIZZARD, MA., ERDMAN, SL., FORSTERMANN, U., DE GROAT, WC. 1994. Differential distribution of nitric oxide synthase in neural pathways to

the urogenital organs. *Brain. Res.* 646: 279-291.

WANG, Y., GOLIGORSKY, MS., LIN, M ET AL. 1997. A novel, testis specific mRNA transcript encoding an NH₂ terminal truncated nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 272: 11392-11401.

WASSARMAN, PM. 1987. The biology and chemistry of fertilization. *Science.* 235: 553-560.

WEINER, C. P. ; LIZASOAIN, I. et al. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by Sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 19, p. 5212-5216, 1994.

WELCH, C.; WATSON, M. E. et al. Evidence to suggest nitric oxide is a interstitial regulator of Leydig cell steroidogenesis. *Metabolism*, v. 44, p. 234-238, 1995.

WIN, N. H. H. et al. A new and potent calmodulin antagonist, HF-2035, which inhibits vascular relaxation induced by nitric oxide synthase. *Eu. J. Pharmacol.*, v. 229, p. 119-126, 1996.

WOLFF, D. J.; LUBESKIE, A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivation of nitric oxide synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 316, p. 290-301, 1995.

XIA, Y.; DAWSON, T. M. et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 93, p. 6770-6774, 1996.

YALLAMPALLI, C., GARFIELD, RE., BYAM-SHMITH, M. 1993. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. *Endocrinology.* 133: 1899-1902.

ZARRINDAST, MR., MAMANPUSH, SM., RASHIDY-POUR, A. 1994. Morphine inhibits dopaminergic and cholinergic induced ejaculation in rats. *Gen. Parmacol.* 25: 803-808.

ZINI, A., O'BRYAN, MK., MAGID, MS., SCHLEGEL, PN. 1996. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol.*

Reprod. 55: 935-941.

ZVARA, P.; SIOUFI, R. et al Nitric oxide mediated penile erection is a testosterone dependent event: a rat erection model. Int. J. Impotence Res., v. 7, p. 209-219, 1995.