

JOSÉ RONALDO VASCONCELOS DA GRAÇA

**O CITRATO DE SILDENAFIL (VIAGRA®) INIBE A MOTILIDADE
GASTRINTESTINAL EM RATOS ACORDADOS E ANESTESIADOS E A
CONTRATILIDADE IN VITRO DE TIRAS ISOLADAS DE DUODENO DE
RATOS *EX VIVO*.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Armenio Aguiar dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Hélio Rola

Fortaleza, Ceará, Brasil, 2005

Esta tese será apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da referida Universidade.

José Ronaldo Vasconcelos da Graça

Tese submetida em: ____/____/2005

Orientador: Prof. Dr. Armenio Aguiar dos Santos
FAMED – UFC

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Hélio Rola
FAMED – UFC

Profa. Dra. Maria Cristina O. Salgado
FMRP - USP – São Paulo

Dr. Miguel Âgelo Nobre e Souza
Bolsista da CAPES junto à FAMED - UFC

Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho
Diretor da FAMED – UFC – Unidade de Sobral

GRAÇA, José Ronaldo Vasconcelos da. O CITRATO DE SILDENAFIL (VIAGRA®) INIBE A MOTILIDADE GASTRINTESTINAL EM RATOS ACORDADOS E ANESTESIADOS E A CONTRATILIDADE IN VITRO DE TIRAS ISOLADAS DE DUODENO DE RATOS *EX VIVO*. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2005, 99 pp. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Sildenafil / Viagra / Motilidade gastrointestinal / Esvaziamento gástrico / Complacência gástrica / Trânsito gastrointestinal / Trânsito intestinal / contratilidade in vitro / fosfodiesterase-5 / GMP cíclico / Ratos

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação:

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

Professora da Disciplina de Farmacologia Clínica e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Orientador:

Prof. Dr. Armenio Aguiar dos Santos

Professor da Disciplina de Fisiologia Humana e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Co-orientador:

Prof. Dr. Francisco Hélio Rola

Professor da e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, membro do PROPAP.

À minha família....

Aos meus orientadores: Profs. Armênio e Hélio....

Aos meus amigos....

**... época difícil a nossa em que é mais fácil
quebrar um átomo do que um preconceito...**

(A. Einstein)

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Francisco Hélio Rola e Armênio Aguiar dos Santos, por seus ensinamentos ao longo deste mais de 12 anos de convivência, fundamentais para minha formação pessoal, ética e científica. Dentre outras lições, o Laboratório Escola deve ao mestre Hélio a concepção da idéia, ainda nos idos de 1998, de estudarmos o efeito gastrointestinal do Viagra®;

Meu especial obrigado ao colega do Laboratório Escola, contemporâneo do mestrado, doutorado... Prof. Francisco de Assis Gondim (o Cid), pelo apoio e cooperação nos manuscritos oriundos deste estudo e por fazer parte da minha formação acadêmica;

Ao Prof. Daniel Sifrim da KU Leven – Bélgica, pelo acolhimento no estrangeiro com contribuições para minha formação científica e crescimento pessoal durante a empreitada nesta universidade;

A todos os colegas do Laboratório Escola, pelo apoio e cooperação na realização dos trabalhos relacionados a este estudo e, especialmente aos colegas médicos Mauro Rosalmeida, Luciana Duarte, Paula Vasconcelos, Marcel Nóbrega, Bruno Ivo. Aos atuais alunos de iniciação científica Cristiano Clemente, Gislano Lira, Bruno Medeiros, Camila Santos, na impossibilidade de citar todos.....

Lembro com saudades dos momentos de convivência com os médicos Paulo Roberto Lacerda Leal, Cleonísio Leite Rodrigues, Flávio Duarte Camurça, Raquel Pinheiro Dantas e Augusto Celso Lopes Jr. pelo companheirismo ao longo desses anos. Minha saudação à nova geração de pós-graduandos do Laboratório Escola, representados pelo mestrando Raimundo Palheta, que se renova a cada dia.....

Aos meus colegas e companheiros da FAMED-Sobral, aqui representados pelos Profs. Gerardo Cristino, Vicente Pinto e Mirna Marques, pela cooperação e entendimento quando de minhas ausências de Sobral, por conta do processo de doutoramento...

Ao técnico Haroldo Pinheiro que prontamente atende as necessidades do Laboratório Escola em termos de material e animais usados nos experimentos e pelo companheirismo nestes anos de convivência.

Ao Professor Pedro Magalhães, pela supervisão atenta dos experimentos de contratilidade *in vitro*, uma parte importante deste estudo;

À Coordenação, docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, nas pessoas da Profa. Elisabete Moraes, do Prof. Ronaldo Ribeiro e das Srta. Sílvia Lima e Sra. Aúrea Lyda pelo acolhimento no processo de doutoramento;

Ao Serviço de Medicina Nuclear do Instituto do Câncer do Ceará, em especial ao Dr. Francisco de Assis da Silva (*In memoriam*), Dr. Júlio Marcus Sousa Correia e a técnica Elisabete Nogueira Eloy, pela atenção dispensada nos estudos de trânsito intestinal por cintilografia;

Às agências de fomento à pesquisa (CNPq e FUNCAP), bem como à UNIMED-Sobral, na pessoa do Dr. Ricardo Neves, pelo apoio financeiro. À empresa Pfizer, pela cessão do citrato de sildenafil em sua forma pura, o que conferiu maior fidedignidade aos presentes resultados;

À minha família, Roberto Nogueira, Maria Mirtô e Gracileir Vasconcelos da Graça, entre outros, que fizeram dos meus sonhos os seus sonhos na busca dos meus ideais.

Sumário

I - Lista de abreviações.....	11
II - Lista de figuras.....	13
III – Lista de apêndices.....	16
IV – Lista de anexos	17
V – Resumo	18
VI – Abstract	20
1 - INTRODUÇÃO.....	22
1.1 – Objetivos.....	25
2 – MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS.....	28
2.1 - Estudo I - Efeito do citrato de sildenafil sobre o esvaziamento gástrico (EG) e sobre o trânsito gastrointestinal (GI) de líquido em ratos acordados.....	30
2.1.1 - Procedimentos cirúrgicos	30
2.1.2 - Determinação do EG e do trânsito GI.....	30
2.1.3 – Monitoração da Pressão Arterial (PA).....	32
2.1.4 - Desenho experimental.....	32
2.1.5 - Análise estatística.....	33
2.1.6 – Resultados de EG e trânsito GI.....	33
2.2 - Estudo II - Efeito do citrato de sildenafil sobre o trânsito intestinal de líquido em ratos acordados.....	37
2.2.1 - Procedimentos cirúrgicos e desenho experimental.....	37
2.2.2 - Registro da pressão arterial (PA).....	37
2.2.3 - Determinação do trânsito intestinal.....	38
2.2.4 – Resultados de TI.....	40

2.3 - Estudo III - Efeito do citrato de sildenafil sobre a complacência gástrica de ratos anestesiados.....	43
2.3.1 - Procedimentos cirúrgicos.....	43
2.3.2 - Medida do volume gástrico (VG).....	43
2.3.3 – Monitoração da Pressão Arterial (PA).....	44
2.3.4 - Protocolos experimentais.....	44
2.3.4.1 - Efeito do sildenafil sobre o volume gástrico (VG).....	44
2.3.4.2 - Participação de vias regulatórias do fenômeno.....	45
2.3.4.2.1 – Esplancnotomia.....	45
2.3.4.2.2 – Drogas.....	46
2.3.5 - Avaliação Experimental.....	47
2.3.6 - Análise Estatística.....	47
2.3.7 – Resultados de complacência gástrica.....	47
2.4 – Estudo IV- Efeito do citrato de sildenafil sobre a contratilidade de tiras isoladas do duodeno de ratos <i>ex vivo</i>	52
2.4.1 - Animais e preparação das tiras.....	52
2.4.2 - Soluções e drogas empregadas.....	52
2.4.3 - Protocolos experimentais.....	53
2.4.4 - Análise estatística.....	55
2.4.5 – Resultados de contratilidade <i>in vitro</i> de tiras duodenais.....	56
2.4.5.1 - Efeitos antiespasmódico e mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações induzidas por acetilcolina e carbacol em tiras isoladas de duodeno de ratos.....	56
2.4.5.2 – Efeito inibitório do sildenafil sobre a atividade contrátil espontânea de tiras isoladas de duodeno de rato.....	57
2.4.5.3 – Efeito de inibidores da guanilato ciclase sobre a ação	

miorelaxante do sildenafil em tiras isoladas de duodeno de ratos.....	58
2.4.5.4 – Participação da via nitrérgica na ação miorelaxante do sildenafil em tiras isoladas de duodeno de ratos.....	59
2.4.5.5 – Participação do AMP cíclico na ação miorelaxante do sildenafil em tiras isoladas de duodeno de ratos.....	60
3- DISCUSSÃO.....	62
4 - CONCLUSÕES.....	74
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
6. APÊNDICES	90
7. ANEXOS	99

I - Lista de Abreviações

-
- % - Percentual
- ~ - Aproximadamente
- ® - Marca Registrada
- °C – Grau Célcus
- ^{99m}Tc – Tecnécio noventa e nove
- ACh – Acetilcolina
- ADP – Adenosina Difosfato
- AM- Azul de Metileno
- AMP – Adenilato Monofosfato
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CCh – Carbacol
- cm – Centímetro
- cmH₂O – Centímetro de Água
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- Cols. – Colaboradores
- d - dia
- DE – Diâmetro Externo
- DI – Diâmetro Interno
- D-NAME - D-nitro-arginina-metil-éster
- e.v. – Endovenoso
- EC₅₀ – Concentração Capaz de Promover 50% do Efeito
- EG – Esvaziamento Gástrico
- EPM – Erro Padrão da Média
- et al. – e colaboradores
- FDA – Food and Drugs Administration
- FDE – fosfodiesterase
- FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- g- Grama
- GI – Gastrintestinal
- GMP – Guanilato Monofosfato
- h - hora
- HCl – Ácido Clorídrico
- Hz – Hertz
- I.P. – Intraperitoneal
- IC₅₀ – Concentração Capaz de Inibir 50% do Efeito
- KCl – Cloreto de Potássio
- Kg – Quilograma
- L – Litro
- L-Arg - L-Arginina
- L-NAME – L-nitro-arginina-metil-éster
- M – Molar
- MBq – Mega Bequerel
- mg – Miligrama

- MgCl_2 – Cloreto de Magnésio
- min - minuto
- mL – Mililitro
- mM – Milimolar
- mmHg – Milímetros de Mercúrio
- MS – Ministério da Saúde
- N – Normal
- NPS – Nitroprussiato de Sódio
- n – número de observações
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NaH_2PO_4 – Fosfato Diácido de Sódio
- NaHCO_3 – Bicarbonato de Sódio
- NANC – Não adrenérgico Não Colinérgico
- NaOH – Hidróxido de Sódio
- nm – Nanômetro
- NO – Óxido Nítrico
- ODQ - 1H-(1,2,4)-oxadiazole-(4,3-a)-quinoxalin-1-one
- p – Intervalo de Significância
- PA – Pressão Arterial
- PE – Polietileno
- pH – Potencial de Hidrogênio
- Prop – Propranolol
- rpm – Rotação Por Minuto
- s - segundo
- Sil – Sildenafil
- TGI – Trato Gastrintestinal
- TI – Trânsito Intestinal
- U – Unidade Internacional
- UFC – Universidade Federal do Ceará
- VG - Volume Gástrico
- vs – versus
- wt:vol – Peso:Volume
- μM – Micromolar
- μmol – Micromol

Nota de Apresentação

Este trabalho apresenta uma idéia pioneira e inovadora do Prof. Francisco Hélio Rola, proposta ainda em 1999, de estudar os efeitos do citrato de sildenafil (Viagra®) sobre a motilidade gastrintestinal, medicamento lançado no mercado, ainda em 1998, para tratamento de impotência humana.

A idéia foi fundamentada na propriedade deste fármaco em promover relaxamento da musculatura lisa vascular, e, tendo em vista o trato gastrintestinal apresentar músculo liso em sua maior composição, então decidimos avaliar os efeitos do citrato de sildenafil sobre a motilidade gastrintestinal.

II- Lista de Figuras

- Figura 2.1.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil ou diluente sobre a taxa de EG e trânsito GI de líquido em ratos acordados..... 32**
- Figura 2.1.2 – Retenção gástrica fracional e pressão arterial (PA) em ratos acordados tratados com sildenafil ou veículo..... 34**
- Figura 2.1.3 – Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com sildenafil ou diluente e estudados aos 10, 20 ou 30min pós-prandiais..... 35**
- Figura 2.2.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil ou diluente sobre a taxa de trânsito intestinal de ratos acordados..... 38**
- Figura 2.2.2: Representação esquemática do estudo cintilográfico da progressão intestinal de uma refeição teste em ratos acordados..... 39**
- Figura 2.2.3 - Efeito do sildenafil (4mg/Kg, e.v.) ou diluente (0,2mL HCl 0.01N - e.v.) sobre a distribuição do centro geométrico da refeição teste em ratos acordados..... 41**
- Figura 2.2.4 – Perfis da progressão gastrintestinal da refeição teste de ratos acordados, tratados com sildenafil (4mg/kg) ou veículo (HCl 0,01N) e estudados 20min após a gavagem..... 42**
- Figura 2.3.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil ou veículo sobre o volume gástrico de ratos anestesiados..... 45**
- Figura 2.3.2 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil sobre o volume gástrico e a pressão arterial de ratos anestesiados, estudados cerca de 24h após esplancnotomia..... 45**
- Figura 2.3.3 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil sobre o volume gástrico e sobre a pressão arterial de ratos anestesiados e pré-tratados com propranolol, L-NNA ou Azul de Metileno..... 46**
- Figura 2.3.4 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil sobre o volume gástrico e a pressão arterial de ratos anestesiados e pós-tratados com nitroprussiato de sódio (NPS)..... 46**

- Figura 2.3.5: Efeitos do sildenafil ou diluente (HCl) sobre a pressão arterial (PA, em mmHg) e volume gástrico (VG, em mL) em ratos anestesiados..... 48**
- Figura 2.3.6 - Efeitos do pré-tratamento com Nitro-arginina (L-NNA) e do pós-tratamento com Nitroprussiato de sódio (NPS) sobre os efeitos do sildenafil na pressão arterial média (PA, em mmHg) e volume gástrico (VG, em mL) em ratos anestesiados..... 49**
- Figura 2.3.7 - Efeito do pré-tratamento com Azul de Metileno (AM) sobre a pressão arterial média (PA, em mmHg) e o volume gástrico (VG, em mL) de ratos anestesiados e tratados com sildenafil..... 50**
- Figura 2.3.8 - Efeito do pré-tratamento farmacológico (propranolol) ou cirúrgico (esplancnotomia) sobre a pressão arterial média (PA, em mmHg) e o volume gástrico (VG, em mL) em ratos anestesiados e tratados com sildenafil..... 51**
- Figura 2.4.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil, da papaverina e do zaprinaste (doses crescentes e cumulativas – 0,1 a 300µmol/L) sobre a amplitude e a freqüência das contrações espontâneas de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*. 53**
- Figura 2.4.2 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito antiespasmódico do sildenafil sobre as contrações de tiras isoladas de duodeno de rato “*pos mortem*” induzidas por Acetilcolina (ACh)..... 54**
- Figura 2.4.3 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações de tiras isoladas de duodeno de rato “*pos mortem*” induzidas por Carbacol (CCh)..... 54**
- Figura 2.4.4 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito drogas sobre a propriedade relaxante do sildenafil (doses crescentes e cumulativas – 0,1 a 300µmol/L) observada em tiras isoladas de duodeno de ratos e pré-tratadas com: azul de metileno (AM) (10µmol/L), ODQ (10µmol/L), L-NAME, D-NAME (10µmol/L) e L-arginina (10µmol/L)..... 55**
- Figura 2.4.5 a e b – Efeito antiespasmódico e mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações induzidas por acetilcolina (ACh) e por carbacol (CCh) em tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*..... 56**
- Figura 2.4.5 c – Efeito antiespasmódico e mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações induzidas por acetilcolina (ACh) e por carbacol (CCh) em tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*..... 57**

- Figura 2.4.6 – Efeito inibitório do sildenafil, da papaveria e do zaprinaste sobre as contrações espontâneas de tiras isoladas de duodeno de rato..... 58**
- Figura 2.4.7 – Efeitos do pré-tratamento com azul de metileno (AM) e do ODQ sobre a propriedade mio-relaxante do sildenafil em preparações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*..... 59**
- Figura 2.4.8 – Efeitos do pré-tratamento com L-NAME, D-NAME ou L-Arginina (L-Arg) sobre a propriedade miorelaxante do sildenafil em preparações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*..... 60**
- Figura 2.4.9 – Efeito do pré-tratamento com forskolina sobre a propriedade miorelaxante do sildenafil em preparações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*..... 61**
- Figura 3.1 – Figura ilustrativa do mecanismo de relaxamento do músculo liso..... 69**

III - Lista de Apêndices

APÊNDICE 1 – Valores individuais de retenção gástrica e gastrointestinal nos animais controle e tratados com sildenafil, sacrificados aos 10, 20 e 30min pós-prandiais.

APÊNDICE 2 - Valores individuais de retenção gástrica e gastrointestinal nos animais pré-tratados com omeprazol distribuídos em controle e tratados com sildenafil, sacrificados aos 10min pós-prandial.

APÊNDICE 3 – Valores individuais de pressão arterial (mmHg) do grupo separado de ratos acordados tratados com sildenafil.

APÊNDICE 4 – Valores individuais do centro geométrico da refeição teste (^{99m}TC) ao longo do TGI, nos animais tratados com diluente (controle - HCl) ou com sildenafil (4mg/Kg) nos tempo pós-prandiais de 20, 30 e 40min.

APÊNDICE 5 – Valores individuais do volume gástrico (ml) nos animais anestesiados e tratados com sildenafil (3mg/Kg) ou diluente (HCl) para os estudos de complacência gástrica.

APÊNDICE 6 – Valores individuais do volume gástrico (ml) nos animais anestesiados e tratados com sildenafil (3mg/Kg) para os estudos de complacência gástrica e submetidos à Esplancnotomia ou ao pré-tratamento com azul de metileno, L-NNA, propranolol ou ao pós-tratamento com nitroprussiato de sódio.

APÊNDICE 7 – Valores individuais de pressão arterial (mmHg) nos animais do estudo da complacência gástrica tratados com sildenafil (3mg/g) ou diluente (HCl).

APÊNDICE 8 – Valores individuais de pressão arterial (mmHg) nos animais do estudo da complacência gástrica tratados com sildenafil (3mg/g) e submetidos à esplancnotomia ou ao pré-tratamento com azul de metileno, L-NNA, propranolol ou ao pós-tratamento com nitroprussiato de sódio.

APÊNDICE 9 -Valores individuais do percentual da amplitude e frequência de contração de tiras Isoladas da musculatura longitudinal de duodeno de ratos incubadas com sildenafil, zaprinast, azul de metileno, ODQ, L-NAME, D-NAME, carbacol ou forskolina.

IV - Lista de Anexos

ANEXO 1 –Rosalmeida MC, Rola FH. O sildenafil afeta o esvaziamento gástrico e o trânsito gastrintestinal de uma refeição líquida em ratos acordados? XIX Encontro de Iniciação à Pesquisa da UFC. Fortaleza-Ce. 2000; Resumo-0331.

ANEXO 2 - Araujo PV, Clemente CM, da Graca JR, Rola FH, de Oliveira RB, dos Santos AA, Magalhaes PJ. Inhibitory effect of sildenafil on rat duodenal contractility in vitro: putative cGMP involvement. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005; 32(3):191-15.

ANEXO 3 – Rosalmeida MC, Saraiva LDS, Graça JRV, Ivo BB, Nóbrega MV, Gondim FAA, Rola FH, Santos AA. Sildenafil, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Delays Gastric Emptying and Gastrointestinal Transit of Liquid in Awake Rats. Dig Dis Sci. 2003; 48(10): 2064–68.

ANEXO 4 - Graça JRV, Leal PRL, Gondim FAA, Rola FH, Santos AA. A plethysmometric method for gastric compliance studies in anesthetized rats. J Pharmacol Toxicol Methds. 2000; 43: 25-30.

V – Resumo

Estudamos o efeito do citrato de sildenafil (Viagra®), vasodilatador largamente utilizado na terapêutica da disfunção erétil, sobre o comportamento motor do trato gastrointestinal (TGI) de ratos Wistar. Para tanto, utilizamos 175 animais machos, pesando entre 200 a 350g, distribuídos nos quatro seguintes grupos de estudo: efeitos do citrato de sildenafil sobre o i) esvaziamento gástrico (EG) e os trânsitos gastrintestinal (GI) e ii) intestinal de líquido em ratos acordados; iii) a complacência gástrica de ratos anestesiados e iv) a contratilidade de tiras isoladas do duodeno de ratos *ex vivo*.

i) Avaliamos, em 64 ratos acordados sob jejum e livre acesso à água por 24h, o efeito da injeção (0,2mL; e.v.) de sildenafil (4mg/Kg) ou veículo (HCl 0,01N) sobre o EG e o trânsito GI de líquido, bem como sobre a pressão arterial (PA). Mediante gavagem, 1,5mL da refeição-teste (vermelho de fenol - 0,5mg/mL em glicose a 5%) foi injetada no estômago. Depois de 10, 20 ou 30min, sacrificamos os animais e, após laparotomia, obstruímos o piloro, o cárdia e o íleo terminal. Removemos e dividimos o TGI em: estômago e segmentos consecutivos do intestino delgado (40% iniciais; 30% mediais e 30% terminais). Após o processamento destas porções viscerais, determinamos as absorbâncias das amostras a 560nm. A retenção fracional de vermelho fenol em cada segmento permitiu o cálculo do EG e trânsito GI. Em um grupo separado de animais, a PA foi monitorada continuamente por meio de um sistema digital de aquisição de dados durante 20min antes e 30min após o tratamento com sildenafil ou diluente. Comparado ao grupo controle, houve aumento significativo da retenção gástrica ($44,2 \pm 2,0$ vs $53,2 \pm 2,1$; $25,4 \pm 1,3$ vs $37,3 \pm 1,6$; $20,9 \pm 2,5$ vs $32,5 \pm 2,9\%$) nos animais tratados com sildenafil e sacrificados aos 10, 20, ou 30min, respectivamente, bem como retarde significativo no trânsito GI. Embora o sildenafil tenha provocado hipotensão, a PA retoma níveis basais logo após 10min. O pré-tratamento com omeprazol (bloqueador da secreção ácida estomacal) não modificou o efeito do sildenafil sobre os valores de retenção gástrica e intestinal nem nos níveis de PA.

ii) Noutros animais (n=44), sob jejum de 24h e dotados previamente (3d) de uma cânula crônica no bulbo duodenal, estudamos o efeito do sildenafil sobre a progressão ao longo do intestino delgado de uma refeição teste (10MBq de Tecnécio ligado a fitato e diluído em 1mL de salina 0,9%). Decorridos 20, 30 ou 40min da injeção (0,2mL e.v.) de sildenafil (4mg/Kg) ou diluente (HCL 0,01N), sacrificamos os animais e, após laparotomia e remoção do TGI, dividimo-o em: estômago, cinco segmentos congruentes e consecutivos de intestino delgado e o intestino grosso. A contagem da radiatividade foi determinada num colimador de gama-câmara. O sildenafil promoveu retarde ($p < 0,05$) do TI, indicado pelos retardes dos centros geométricos da refeição de $2,8 \pm 0,2$ vs $3,3 \pm 0,1$; $3,0 \pm 0,2$ vs $3,7 \pm 0,1$ e $3,4 \pm 0,1$ vs $4,2 \pm 0,2$ em relação ao grupo controle, aos 20, 30 ou 40min.

iii) Os estudos de complacência gástrica foram conduzidos em 39 ratos anestesiados, sob jejum de 24h. As variações do volume gástrico (VG), foram medidas por pletismografia, enquanto a PA foi

monitorada continuamente por um sistema digital de aquisição de dados. Em relação aos valores basais ($2,91 \pm 0,19$ mL) o sildenafil (3 mg/Kg - e.v.) aumentou ($p < 0,05$) o VG após 10, 20 e 30 min ($3,08 \pm 0,18$; $3,10 \pm 0,17$ e $3,09 \pm 0,17$ mL). A PA basal ($105,8 \pm 2,28$ mmHg) caiu significativamente com o sildenafil ($59,8 \pm 3,2$; $64,8 \pm 3,7$ e $59,3 \pm 4,6$ mmHg) enquanto o diluente (HCl $0,01 \text{ N}$) não modificou seja o VG ou a PA. O pré-tratamento mediante esplanctomia ou injeção e.v. com azul de metileno (3 mg/Kg -bloqueador da guanilato ciclase), L-NNA (3 mg/Kg -bloqueador da NO sintetase) ou propranolol (2 mg/Kg - β -bloqueador) preveniram o aumento do VG pelo sildenafil; já o pós-tratamento com nitroprussiato de sódio (1 mg/Kg - e.v.) o ampliou significativamente. iv) Avaliamos ainda o efeito do sildenafil sobre a contratilidade de tiras isoladas do duodeno de ratos *ex vivo* ($n=28$), sacrificados por deslocamento cervical. Tiras dissecadas do duodeno foram suspensas longitudinalmente em cuba de vidro (10 mL), plena de solução de Tyrode (37°C e $\text{pH } 7,4$), e submetidas a uma tensão inicial de 1 g . Após 1 h de estabilização, a contratilidade espontânea ou induzida das tiras foi registrada continuamente por um sistema digital de aquisição de dados. O sildenafil em doses crescentes e cumulativas ($0,1$ a $300 \mu\text{mol/L}$) relaxou (EC_{50} de $9,6 \mu\text{mol/L}$) o duodeno, mais até que o zaprinaste ou a papaverina (bloqueadores de FDEs) (EC_{50} $91,6$ e $78,5 \mu\text{mol/L}$, nesta ordem). Observamos ademais que o sildenafil inibiu as contrações induzidas por acetilcolina ou carbacol (IC_{50} $26,7$ e $16,2 \mu\text{mol/L}$, respectivamente). Já o pré-tratamento com azul de metileno, ODQ (bloqueador da guanilato ciclase) ou L-NAME (bloqueador da NO sintetase), mas não o D-NAME (isômero inativo da NO sintetase) preveniram o efeito do sildenafil. O efeito mio-relaxante do sildenafil foi ampliado pela L-arginina (substrato do NO sintetase) ou nitroprussiato de sódio (doador de NO). O pré-tratamento com forskolina (estimulador da adenilato ciclase) também aumentou o efeito mio-relaxante do sildenafil. Em resumo, observamos que o sildenafil diminui a motilidade gastrointestinal, retardando o EG, os trânsitos GI e intestinal de líquido em ratos acordados; aumenta a complacência gástrica em ratos anestesiados além de apresentar efeitos antiespasmódico e mio-relaxante sobre tiras isoladas de duodeno de ratos *ex vivo*; por estimulação do sistema nervoso simpático e tendo como provável mecanismo de ação ao nível do miócito gastrointestinal a via do NO/GMP cíclico.

VI – Abstract

We evaluated the effect of sildenafil citrate (Viagra®) a vasodilator largely used for the treatment of male erectile dysfunction, on the gastrointestinal motility in rats. Experiments were performed on 175 male, Wistar rats, weighing 200-350g. Four groups of study were done: the sildenafil effects on the: i) Gastric emptying (GE) and gastrointestinal (GI) transit and ii) Intestinal transit (IT) of liquid in awake rats; iii) Gastric compliance in anesthetized rats and iv) Contractility of rat duodenal isolated strips. i) In 64 rats fasted for 24h with previous vascular access (right jugular vein and left carotid artery), we studied the effect of an i.v. injection (0.2mL) of sildenafil (4mg/Kg) or vehicle (0.01N HCl) on GE and GI transit of a liquid meal, as well as on arterial pressure (AP) in a separated group of rats. Animals were gavage-fed with 1.5mL of a test meal (0.5mg/mL of phenol red in 5% glucose). After 10, 20 or 30min, animals were sacrificed and submitted to a laparotomy to obstruct the pylorus, cardia and terminal ileus. The gut was removed and then divided into: stomach and consecutive three small intestine segments (40% proximal; 30% medial and 30% terminal). After processing these segments, the dye retention was determined at 560nm. The percentage of dye retention in each segment permitted to evaluate GE and GI transit. Arterial pressure was continuously monitored by a digital acquisition system during 20min before and 30min after sildenafil injection. We observed a significant increase of gastric retention in sildenafil treated rats at 10, 20, or 30min after the test meal ($44,2\pm 2,0$ vs $53,2\pm 2,1$; $25,4\pm 1,3$ vs $37,3\pm 1,6$; $20,9\pm 2,5$ vs $32,5\pm 2,9\%$, respectively), as well as a significant GI transit delay. Despite of sildenafil inducing hypotension, AP returned to basal levels 10min afterwards. Acid gastic secretion blocking pre-treatment with omeprazol did not modify the sildenafil effect on gastric retention, GI transit or AP. ii) In another group we evaluated the sildenafil (4mg/Kg) or diluente (0.01N HCl, 0.2mL) effects on the IT in awake rats, fasted for 24h. Animals were studied 3d after the insertion of a silastic cannula (0.6cm ID) into the duodenal bulb. We evaluated the progression of a radioactive liquid test meal fed (10MBq of ^{99m}Tc - 1mL of saline 0,9%) administered through the inserted cannula into the small intestine. After 20, 30 or 40min, animals were sacrificed by anesthetic overdose. After laparotomy, we removed and divided the gut in: stomach, five congruent and consecutive segments of the small intestine and the large intestine. Radioactivity counting was obtained in a gamma-chamber collimator. Sildenafil promoted an IT delay ($p<0.05$), indicated by shifting the center of mass to the proximal portions of the TGI (2.8 ± 0.2 vs 3.3 ± 0.1 ; 3.0 ± 0.2 vs 3.7 ± 0.1 and 3.4 ± 0.1 vs 4.2 ± 0.2) in relation to control group. iii) Gastric compliance study was performed on 39 anesthetized rats after 24h of fasting. Gastric volume (GV) variations were measured by plethysmography while AP was continuously monitored. We have also observed that GV increased ($p<0.05$) after sildenafil treatment (3mg/Kg - e.v) (3.08 ± 0.18 ; 3.10 ± 0.17 and $3.09\pm 0.17\text{mL}$ vs $2.91\pm 0.19\text{mL}$) at 10,

20 and 30min after drug administration, respectively. Basal AP (105.8 ± 2.28 mmHg) dropped by the sildenafil injection (59.8 ± 3.2 ; 64.8 ± 3.7 and 59.3 ± 4.6 mmHg- $p < 0.05$) while vehicle (0.01N HCl) did not change either GV or AP. After splanchnotomy or pre-treatments (e.v.) with methylene blue (3mg/Kg-guanilate cyclase blocker), L-NNA (3mg/Kg - NO synthase blocker) or propranolol (2mg/Kg - β -blocker) prevented GV increase due to sildenafil; while post-treatment with sodium nitroprusside (1mg/Kg - NO donor) raised it.

iv) The *in vitro* contractility studies were performed on isolated duodenal strips obtained from rats ($n=28$) killed by cervical dislocation. Duodenal strips were suspended longitudinally in a glass chamber (10mL), filled with Tyrode solution (37°C and pH 7.4). After 1h of stabilization under 1g of initial tension, the spontaneous or induced contractility were continuously recorded by a digital acquisition system. Increasing and cumulative doses of sildenafil (0.1 to $300 \mu\text{mol/L}$) relaxed ($9.6 \mu\text{mol/L}$ of EC_{50}) the duodenal strips. This effect was more intense than those displayed by zaprinast or papaverine (PDEs blockers) (91.6 and $78.5 \mu\text{mol/L}$ of EC_{50} , in this order). Sildenafil showed significant antispasmodic and myorelaxant effects on the duodenal contractions induced by acetylcholine or carbamylcholine (IC_{50} 26.7 and $16.2 \mu\text{mol/L}$, respectively). Pre-treatment with methylene blue, ODC (guanilate cyclase blocker) or L-NAME (NO synthase blocker) also prevented these sildenafil effects, but D-NAME (an inactive substrate for NO synthase) did not. Myorelaxant sildenafil effect was reverted by L-arginine (substrate for NO synthase) and contrarily it was largely increased by sodium nitroprusside. Forskolin adenylate cyclase activation pre-treatment also increased the myorelaxant effect of sildenafil.

In summary, we have observed that sildenafil slowed down the gastrointestinal motility, delaying GE, GI and intestinal transits of a liquid meal in awake rats; Gastric compliance was also increased in anesthetized rats treated with sildenafil. Sildenafil also exhibited both antispasmodic and myorelaxant effects on isolated strips of duodenum of *ex vivo* rats. Besides central or peripheral sympathetic nervous system activation, sildenafil possibly acts at the gastrointestinal myocyte level by activating the NO/GMPc system.

“Na convivência democrática, a razão e a força não são argumentos para obrigar e sim instrumentos de ação na realização de um propósito comum que não é outro senão a convivência democrática.”

Humberto maturana

1 - INTRODUÇÃO

Em fins dos anos 90, durante uma série de estudos acerca dos efeitos de variações agudas da volemia sobre o comportamento motor do trato gastrintestinal (TGI) de cães e ratos (Gondim *et al.*, 1999; Graça *et al.*, 2002), tomei conhecimento de novo e revolucionário tratamento para a impotência sexual, os comprimidos azuis de Viagra®. Graças suas propriedades vasodilatadoras descobertas em 1989, inicialmente o citrato de sildenafil foi testado em pacientes com *angina pectoris*. Embora os ensaios clínicos não tenham sido promissores quanto à irrigação miocárdica, logo se tornou evidente a eficácia terapêutica do novo fármaco na disfunção erétil (Boolell *et al.*, 1996 a e b; Goldenberger, 1998; Goldstein, 1998; Moreland *et al.*, 1999; Raja *et al.*, 2004).

O citrato de sildenafil (1- [4- etoxi- 3- (6,7- diidro- 1-metil- 7- oxi- 3-propil-1 H- pirazolo [4,3- d] pirimidina- 5- il) fenilsulfonil] - 4 - metil piperazina) (Viagra®) é um composto relativamente lipofílico com centro básico na amina terciária piperazina (Walker *et al.*, 1999). Considera-se que o sildenafil tenha como mecanismo básico de ação o bloqueio seletivo e potente da fosfodiesterase do tipo 5 (FDE-5); impedindo desta forma, a hidrólise da guanosina monofostato cíclico (GMPc) - nucleotídeo existente nas células da musculatura lisa vascular (Ballard *et al.*, 1998; Turko *et al.*, 1999). A seletividade deste fármaco depende da dose e do tecido estudado. Em preparações *in vitro* de tiras isoladas de tecido peniano masculino, o sildenafil apresenta concentração inibitória 50% (IC₅₀) da ordem de 4nM segundo Ballard e colaboradores (1998); Walker e colaboradores (1999) e Agha e colaboradores (2001).

Tendo em vista a expressão da FDE-5 em outros tecidos como artérias e veias da musculatura esquelética, artérias e veias pulmonares e coronárias, plaquetas, musculatura lisa visceral (brônquios, útero e trompas) (Raja *et al.*, 2004) e musculatura lisa do trato gastrintestinal (Sopory *et al.*, 2004), têm sido propostas novas indicações terapêuticas para o sildenafil. Recentemente, o “Food and Drug Administration” (FDA), órgão do governo

norte americano encarregado da regulação sanitária, aprovou o uso terapêutico do sildenafil no manejo de pacientes acometidos com hipertensão pulmonar (Kulkarni *et al.*, 2004).

Há inclusive indicações da ação do sildenafil sobre o sistema nervoso central, pois o mesmo atravessa a barreira hematoencefálica, promovendo ativação simpática, tanto central como periférica (Phillips *et al.*, 2000). Vale salientar que camundongos submetidos à interrupção de tratamento crônico com sildenafil exibem comportamento considerado agressivo (Hotchkiss *et al.*, 2005).

Em relação às vísceras abdominais, foi verificado que o tubo digestivo dispõe de todos os elementos do sistema GMPc, inclusive as enzimas fosfodiesterases e dentre elas a do tipo 5 (Kause *et al.*, 1994; Murthy *et al.*, 2001; Kaneda *et al.*, 2003 e Sopory *et al.*, 2004). Nas células da musculatura lisa gastrintestinal, a inativação da fosfodiesterase do tipo 5 pode aumentar os níveis intracelulares de GMPc, que ao promover a diminuição da concentração intracelular de Ca^{++} livre levaria ao relaxamento do miócito gastrintestinal (Zhang *et al.*, 2001; Bortolotti *et al.*, 2001).

Evidências publicadas no decorrer da realização deste trabalho reforçaram nossa idéia de o sildenafil interferir na motilidade do TGI, originalmente desenvolvida ainda no início de 1999 (Rosalmeida *et al.*, 2000 – *vide* Anexo I). Ainda em 2000, surge o primeiro relato do potencial terapêutico do sildenafil nos distúrbios da motilidade gastrintestinal. Mediante estudos de manometria esofágica, Bortolotti e colaboradores (2000) descreveram que o sildenafil relaxa o esfíncter esofágico inferior de pacientes com acalasia idiopática. Em gatos anestesiados, Zhang e colaboradores (2001) verificaram também mediante manometria esofágica, que o sildenafil diminui a peristalse esofágica e a pressão no esfíncter esofágico inferior. A seguir, Bortolotti e colaboradores (2001) estudando voluntários sadios sob manometria verificaram que o sildenafil diminui a

força das contrações antro-duodenais. Ademais, o sildenafil também aumenta significativamente a retenção gástrica pós-prandial enquanto retarda o esvaziamento gástrico de líquido em voluntários saudáveis, segundo Sarnelli e colaboradores (2004).

1.1 - Objetivos

Assim sendo, a motivação principal deste trabalho consistiu em caracterizar o efeito do sildenafil sobre a motilidade gastrointestinal e para tanto verificamos o efeito do sildenafil sobre o (a):

- ✓ 1 – Esvaziamento gástrico (EG) e trânsito gastrointestinal (GI) de líquido em ratos acordados;

O sildenafil promove o retardo tanto do EG como do trânsito GI de refeição líquida, efeito este dose-dependente e que persiste mesmo após a normalização da pressão arterial. Os resultados deste estudo estão publicados na forma de resumo (Rosalmeida *et al.*, 2000 e 2002) e trabalho completo (Rosalmeida *et al.*, 2003a).

Considerando que as alterações no padrão de EG e de trânsito GI decorrem da complexa coordenação do comportamento motor do estômago, do piloro e do duodeno proximal (Bell *et al.*, 1975; Schwartz *et al.*, 2001), decidimos investigar o efeito do sildenafil sobre o trânsito intestinal de líquido e a complacência gástrica.

- ✓ 2 – Trânsito intestinal de líquido em ratos acordados;

Mediante cintilografia, foi possível verificar o efeito inibidor do sildenafil sobre o trânsito intestinal *per se*. Os dados deste estudo estão publicados apenas na forma de resumo em congresso internacional (Rosalmeida *et al.*, 2003b).

✓ 3 – Complacência gástrica de ratos anestesiados;

Monitorando o volume gástrico mediante pletismografia, foi possível verificar o efeito inibitório do sildenafil sobre o tônus gástrico. Até o momento, os resultados deste estudo estão também publicados somente na forma de resumo em congresso internacional (Rosalmeida *et al.*, 2002).

Dado o retarde do trânsito intestinal pelo sildenafil, decidimos avaliar seus efeitos sobre a contratilidade *in vitro* de tiras isoladas do duodeno de ratos *ex vivo*.

✓ 4 – Contratilidade espontânea e induzida de tiras isoladas do duodeno de ratos *ex vivo*.

Desta forma, o sildenafil inibe as contrações duodenais, sejam espontâneas ou induzidas pelo carbacol ou acetilcolina, mediante ativação da cascada NO-GMPc enquanto sua ação farmacológica parece também depender dos níveis intracelulares do segundo mensageiro AMPc. Parte destes resultados está publicada como resumos e trabalho completo (Rosalmeida *et al.*, 2002 e 2003a, Araújo *et al.*, 2005).

Haja vista os resultados acima descritos, foi ainda objetivo do nosso estudo a caracterização do papel das vias neurais e os mecanismos de ação no:

- ✓ 1 - Aumento da complacência gástrica de ratos anestesiados secundária ao tratamento com sildenafil;
- ✓ 2 - Efeito miorelaxante e anti-espasmódico do sildenafil sobre tiras isoladas de duodeno de ratos *ex vivo*.

**Mande Notícias do mundo de lá,
Diz quem fica...
(Milton Nascimento/Fernado Brant)**

2 – MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Os experimentos foram realizados com um total de 175 ratos Wistar, machos, provindos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as “Normas para uso e experimentação com animais de laboratório do Ministério da Saúde do Brasil - Resolução 196/2000 do MS”.

Para facilitar o entendimento do leitor, apresentamos o trabalho em (04) quatro grupos de estudos, a saber:

- 1) Efeito do citrato de sildenafil sobre o esvaziamento gástrico e sobre o trânsito gastrintestinal de líquido em ratos acordados;
- 2) Efeito do citrato de sildenafil sobre o trânsito intestinal de líquido em ratos acordados;
- 3) Efeito do citrato de sildenafil sobre a complacência gástrica de ratos anestesiados;
- 4) Efeito do citrato de sildenafil sobre a contratilidade de tiras isoladas do duodeno de ratos *ex vivo*.

O citrato de sildenafil foi gentilmente cedido pela Pfizer™. As demais drogas utilizadas neste estudo foram adquiridas junto a Sigma™, com recursos oriundos do CNPq, da CAPES e da FUNCAP.

2.1 - Estudo I - Efeito do citrato de sildenafil sobre o esvaziamento gástrico (EG) e sobre o trânsito gastrintestinal (GI) de líquido em ratos acordados;

2.1.1 - Procedimentos cirúrgicos

Os experimentos do estudo I foram realizados em 64 ratos Wistar, machos, pesando entre 180-220g.

Os animais foram anestesiados com éter e tiveram a veia jugular direita e a artéria carótida esquerda canuladas para administração de drogas ou veículo e monitoração da pressão arterial (PA), respectivamente. Estes animais foram mantidos em jejum por 24h, entretanto tiveram livre acesso à água até 2h antes dos experimentos. Avaliamos o efeito do pré-tratamento (0,2mL, e.v.) com sildenafil (4mg/Kg) ou somente o respectivo veículo (HCl 0,01N) sobre o esvaziamento gástrico (EG) e o trânsito gastrintestinal (GI) de líquido, bem como sobre a PA de um grupo separado de animais.

2.1.2 - Determinação do EG e do trânsito GI.

Para a determinação do EG e do trânsito GI utilizamos uma técnica descrita inicialmente por Reynell e Spray (1956) e extensivamente utilizada em nosso laboratório, com as devidas adaptações (Rego *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 1999; Camurça *et al.*, 2004).

Inicialmente, os animais receberam mediante gavagem 1,5mL da refeição teste, contendo um marcador não absorvível (vermelho de fenol - 0,5mg/mL em glicose a 5%). Decorridos 10, 20 ou 30min após a administração da refeição, os animais foram, então, sacrificados, por sobrecarga anestésica (pentobarbital). Mediante laparotomia mediana, o estômago e o intestino delgado foram expostos e, em seguida, obstruídos ao nível do piloro, do cárdia e do íleo terminal.

Posteriormente, removemos todo o trato gastrintestinal (TGI), desde o esôfago até o reto. O TGI foi estendido sobre uma prancha

graduada em centímetros e dividido em 4 segmentos consecutivos: estômago; os 40% proximais do intestino delgado; os 30% mediais do intestino delgado e os 30% distais do intestino delgado.

A seguir, cada segmento foi imerso num cilindro graduado para determinação do volume destes segmentos. Em seguida, foram triturados e homogeneizados com 100mL de NaOH 0,1N por meio de um liquidificador de mão (Black and Decker®) durante 30s.

A suspensão foi deixada em repouso durante 20min à temperatura ambiente. Em seguida retiramos do sobrenadante uma alíquota de 10ml que foi centrifugada numa velocidade máxima de 5.000rpm durante 10min, a 2800rpm. Após esse procedimento, uma amostra de 5mL do sobrenadante foi retirada e adicionado 0,5mL de ácido tricloro-acético (20% *wt:vol*), sendo o produto centrifugado a 2800rpm por mais 20min. No final, foram retirados 3mL do novo sobrenadante e adicionados 4mL de NaOH 0,5N de modo a revelar o corante. Determinamos a absorbância da amostra a 560nm utilizando o espectrofotômetro Spectrum®.

A quantidade de vermelho fenol recuperada em cada segmento foi calculada conforme a equação ($m=C \times \text{volume}$). E a percentagem de retenção de vermelho fenol em cada segmento (x) expressa de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Retenção no segmento X} = \frac{\text{Quantidade de VF recuperado no segmento X}}{\Sigma \text{ da quantidade de VF recuperada nos segmentos do TGI}}$$

Σ – Somatório; VF – Vermelho de fenol

A recuperação fracional do corante nos quatro segmentos do TGI permitiu-nos estimar a progressão do marcador ao longo do TGI, que identificamos como índice do trânsito GI. No caso em particular do estômago, a recuperação fracional do corante neste segmento serviu como índice de retenção gástrica.

2.1.3 – Monitoração da pressão arterial

Em um grupo separado de animais (n=8) monitoramos a PA. Com esse propósito, a cânula da artéria carótida direita foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados biológicos (Power-Lab ADInstruments®) registrados em micro-computador. Os registros de PA foram obtidos continuamente por até 60min, ou seja nos 20min iniciais do período basal, nos 10min posteriores ao tratamento com sildenafil ou diluente, bem como durante os 10, 20 ou 30min do período pós-prandial, imediatamente anterior ao sacrifício dos animais (Figuras 2.1.1 e 2.1.2).

2.1.4 - Desenho experimental

Os animais, sob jejum de 24h, foram tratados (0,2mL, e.v.) com sildenafil (4mg/Kg) ou diluente (HCl 0,01N) e após 10min receberam a gavagem de 1,5mL da refeição (0,5mg/mL de vermelho fenol em solução de glicose a 5%). Para determinação do EG e do trânsito GI, os animais foram sacrificados aos 10, 20 ou 30min após a gavagem. Em cada tempo pós-prandial estudamos um sub-grupo de 5 a 9 animais. (Figura 2.1.1)

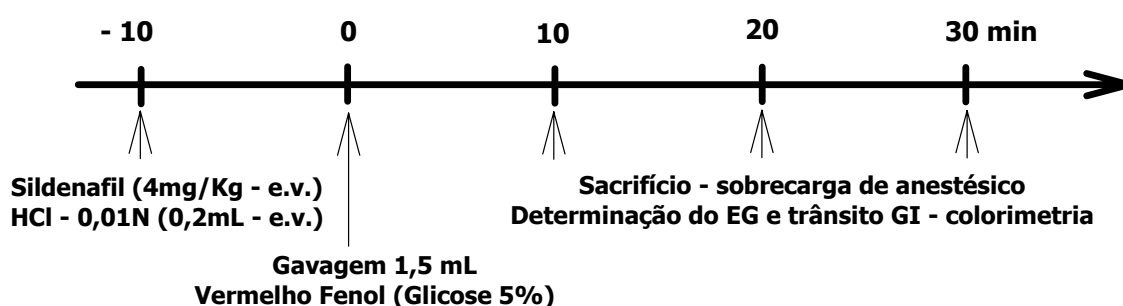


Figura 2.1.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil ou diluente sobre a taxa de EG e trânsito GI de líquido em ratos acordados.

Para avaliar o eventual efeito da secreção ácida gástrica nos resultados obtidos, desenvolvemos um conjunto de experimentos em animais submetidos aos mesmos procedimentos cirurgicos descritos acima. Por ocasião dos experimentos, os animais foram pré-tratados com

omeprazol (20mg/Kg – I.P.) e depois de 2h submetidos à injeção e.v. de sildenafil (n=7) ou diluente (n=4).

2.1.5 - Análise estatística

Os valores relativos à retenção fracional do corante em cada segmento do TGI bem como os relativos à pressão arterial, foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

A análise de variância “One-way ANOVA” seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls foi usada para comparar as diferenças entre as taxas de retenção do corante nos diversos segmentos do tubo digestivo, bem como para comparar as diferenças entre a PA dos diferentes grupos. Diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas com valores de $p < 0,05$ (Bland, 1995).

2.1.6 – Resultados de EG e trânsito GI

Na figura 2.1.2 observamos o efeito do sildenafil sobre a retenção gástrica da refeição teste, bem como sobre a PA nos ratos acordados estudados antes, durante e após o tratamento com sildenafil ou diluente. Observamos aumento da retenção gástrica ($p < 0,05$) de $44,2 \pm 2,0$ para $53,2 \pm 2,1$; de $25,4 \pm 1,3$ para $37,3 \pm 1,6$ e de $20,9 \pm 2,5$ para $32,5 \pm 2,9\%$ nos animais tratados com sildenafil e sacrificados aos 10, 20, e 30min após a gavagem quando comparamos esses animais com os do grupo diluente, respectivamente.

Ainda na figura 2.1.2, observamos que o sildenafil induziu diminuição ($p < 0,05$) da PA em relação ao período basal (de $96,2 \pm 3,0$ para $75,0 \pm 3,0$ mmHg). Este efeito foi, entretanto, fugaz, pois por ocasião da gavagem a diferença nos níveis de PA era mínima em relação ao período basal ($96,3 \pm 3,7$ vs $84,9 \pm 1,8$ mmHg) atingindo patamares similares aos basais nos 30 min pós-prandiais ($96,2 \pm 3,0$ e $98,2 \pm 3,0$ vs $90,6 \pm 3,2$ mmHg).

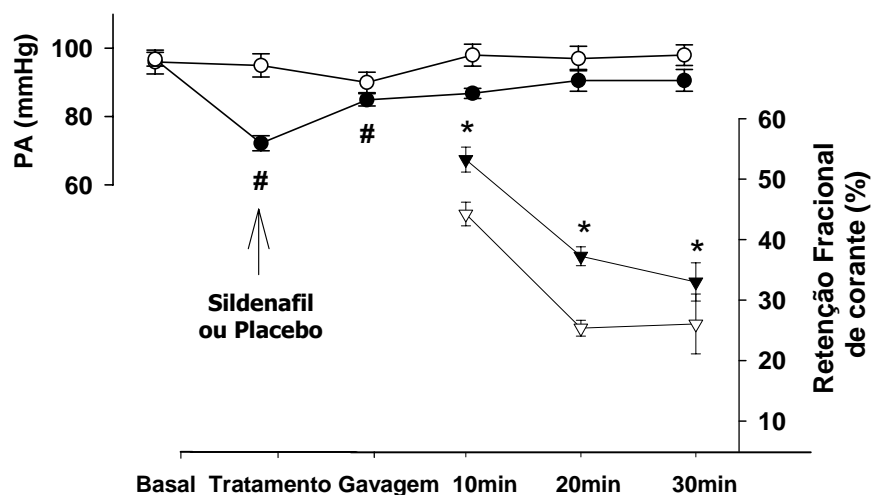


Figura 2.1.2 – Retenção gástrica fracional e pressão arterial (PA) em ratos acordados tratados com sildenafil ou veículo.

Após 20min de monitoração da PA (período basal), os animais receberam injeção e.v (0,2ml) de sildenafil (4mg/kg) ou diluente (HCl 0,01N) (Tratamento). Depois de 10min, os animais

foram gavados com 1,5mL da refeição teste (0,5mg/ml de vermelho fenol em solução glicosada 5%) e sacrificados aos 10, 20, ou 30min pós-prandiais. O percentual (%) da recuperação do corante no estômago em relação ao total, foi determinado por espectrofotometria (560nm). Cada grupo consiste de 5–10 animais, sendo os resultados apresentados como média±EPM. Os valores de PA e de retenção gástrica dos animais tratados com sildenafil estão indicados por círculos (●) e triângulos cheios (▼), já os valores de PA e de retenção gástrica dos animais controle estão indicados por círculos (○) e triângulos vazios (▽), respectivamente. As linhas verticais indicam o erro padrão da média. *, $p < 0,05$ para os valores de retenção gástrica e #, $p < 0,05$ para os de PA (ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

A figura 2.1.3 mostra a retenção fracional de corante ao longo do trato gastrintestestinal dos animais tratados com sildenafil ou diluente, sacrificados aos 10, 20 ou 30min pós-prandiais.

No painel 2.1.3A, podemos observar a retenção fracional de corante no estômago e nos segmentos proximal, medial e distal do intestino delgado dos animais sacrificados aos 10min após a gavagem. Podemos observar que o tratamento com sildenafil ($n=8$) aumentou significativamente em 20,3% a retenção gástrica enquanto diminui ($p < 0,05$) a retenção no segmento medial do intestino delgado de $21,5 \pm 2,4$ para $14,0 \pm 1,1\%$ quando comparamos aos animais que receberam somente diluente ($n=5$). Por outro lado, não houve diferença na retenção de corante nos segmentos proximal e distal do intestino delgado, entre os animais do grupo sildenafil e controle.

Já o painel 2.1.3B mostra a retenção fracional de corante nos segmentos do TGI dos animais tratados com sildenafil ($n=10$) ou veículo ($n=7$), sacrificados aos 20min após a gavagem. O tratamento com sildenafil também aumenta a retenção gástrica em 46,9% enquanto diminui ($p < 0,05$)

a retenção no segmento medial do intestino delgado de $31,8 \pm 2,3$ para $18,0 \pm 0,8\%$ em relação aos animais que receberam apenas diluente. Do mesmo modo, o tratamento com sildenafil não alterou de forma significativa a retenção fracional de corante nos segmentos proximal e distal do intestino delgado.

Já o painel 2.1.3C mostra a retenção fracional de corante nos segmentos do TGI dos animais tratados com sildenafil ($n=9$) ou veículo ($n=6$), sacrificados aos 30min após a gavagem. O tratamento com sildenafil também aumenta a retenção gástrica em 55,6% enquanto diminui ($p<0,05$) a retenção no delgado medial de $39,0 \pm 4,6$ para $22,7 \pm 3,8\%$ quando comparamos aos valores obtidos nos animais do grupo diluente. Da mesma forma, o tratamento com sildenafil não alterou de modo significativo a retenção fracional de corante nos segmentos proximal e distal do intestino delgado.

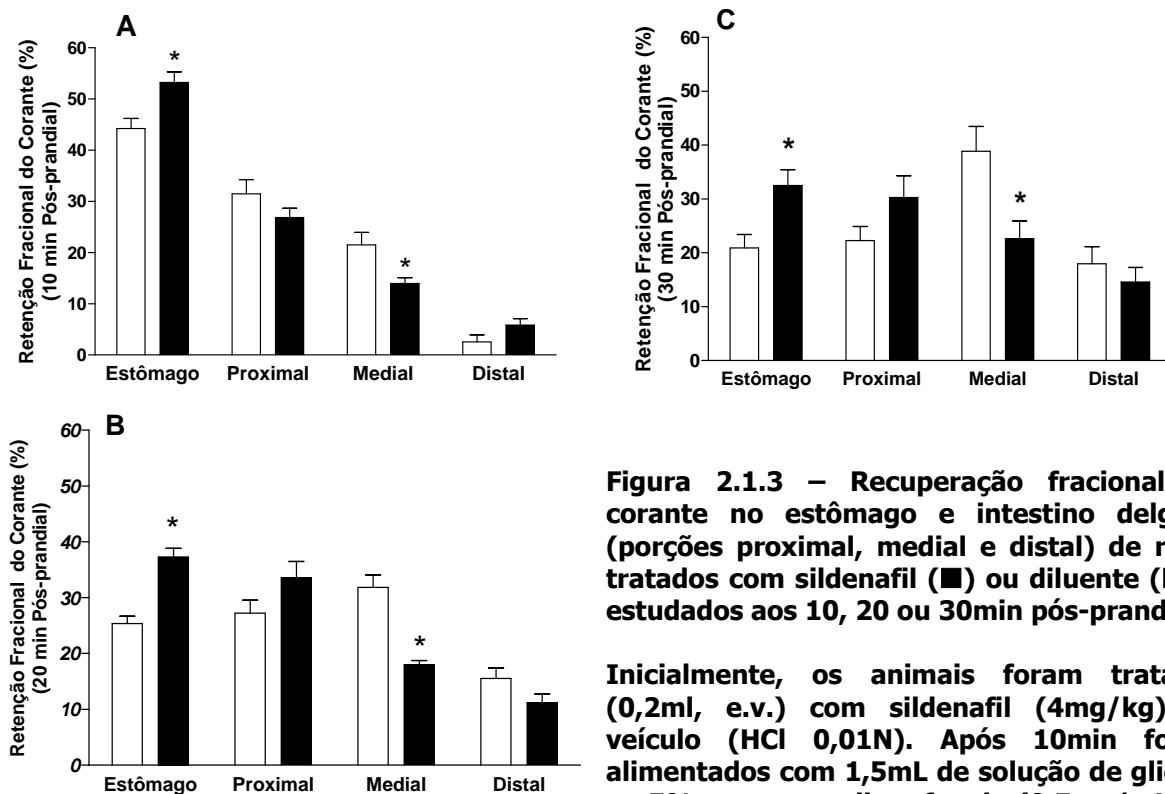


Figura 2.1.3 – Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com sildenafil (■) ou diluente (□) e estudados aos 10, 20 ou 30min pós-prandiais.

Inicialmente, os animais foram tratados (0,2ml, e.v.) com sildenafil (4mg/kg) ou veículo (HCl 0,01N). Após 10min foram alimentados com 1,5mL de solução de glicose a 5% + vermelho fenol (0.5mg/mL) e

sacrificados após 10 (box A), 20 (box B) ou 30min (box C). A recuperação fracional de corante em cada segmento foi obtida por espectrofotometria (560nm), sendo o valor médio da retenção expresso na forma de barras verticais e o erro padrão da média como linhas verticais. *, $P < 0,05$ após ANOVA e teste de Student-Newman-Keuls entre valores do grupo sildenafil vs diluente.

Nos animais pré-tratados com omeprazol, o sildenafil (n=7) também aumentou de forma significativa a retenção gástrica ($28,9 \pm 7,1$ vs $14,1 \pm 2,9\%$) em relação aos animais que receberam somente o diluente (n=8).

2.2 - Estudo II - Efeito do citrato de sildenafil sobre o trânsito intestinal de líquido em ratos acordados

2.2.1 - Procedimentos cirúrgicos e desenho experimental.

Neste grupo de estudo utilizamos ratos Wistar (n=44), machos, pesando entre 180 a 220g. Os animais submetidos a jejum de 24h mas com livre acesso à água, foram anestesiados com tribromo-etanol (0,1mL/100g - 20%). Após laparotomia mediana, uma cânula de silastic (DI 0,6cm) foi inserida através do fundo gástrico e sua extremidade distal posicionada no bulbo duodenal. A seguir, a cânula foi fixada com sutura circular no fundo gástrico e a extremidade livre (devidamente ocluída com um mandril) levada com o auxílio de um trocáter via subcutâneo para a região inter-escapular onde, após transfixar a pele, foi ali fixada. Os animais foram então mantidos por 2 dias em gaiolas individuais com livre acesso à ração triturada e água (Figura 2.2.1).

Decorrido o período de recuperação cirúrgica, os animais foram novamente anestesiados com tribromo-etanol e submetidos à canulação dos vasos cervicais. As extremidades livres dos cateteres (PE 50), plenos de salina heparinizada (500U/mL), foram conduzidas por um trocater pelo subcutâneo para a região inter-escapular onde, após transfixarem a pele, foram ali fixadas. A artéria carótida comum direita foi destinada à monitoração da pressão arterial (PA) e a veia jugular externa esquerda, à administração de fármaco ou veículo.

Finalmente, os animais foram novamente mantidos em jejum por cerca de 16h com livre acesso à água até 2h antes dos estudos do trânsito intestinal.

2.2.2 - Registro da pressão arterial

Em um grupo à parte de animais (n=8) submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, a cânula carotídea foi conectada a um transdutor de pressão, permitindo o registro contínuo das variações da PA em microcomputador (PowerLab-ADInstruments®).

2.2.3 - Determinação do trânsito intestinal.

O trânsito intestinal (TI) foi estimado mediante cintilografia a partir da progressão entérica de uma refeição teste, marcada com elemento radiativo (tecnécio – ^{99m}Tc).

Inicialmente, os animais foram divididos nos grupos *tratado* ou *controle*. Os animais do grupo *tratado* receberam injeção (0,2mL – e.v.) de sildenafil (4mg/Kg), enquanto os do grupo *controle* receberam apenas o diluente (HCl 0,01N). Após 10min, a refeição teste (10MBq de ^{99m}Tc revestido por fitato e diluídos em 1mL de salina) foi injetada diretamente no duodeno através da cânula duodenal.

Decorridos 20, 30 ou 40min da administração da refeição teste, sacrificamos os animais por aprofundamento anestésico com pentobarbital. Após laparotomia, o trato gastrointestinal foi imediatamente segmentado por meio de ligaduras obstrutivas ao nível do cárdia, a 1cm do esfíncter pilórico, na região íleo-cecal e no reto-sigmóide (Figura 2.2.1 e 2.2.2).

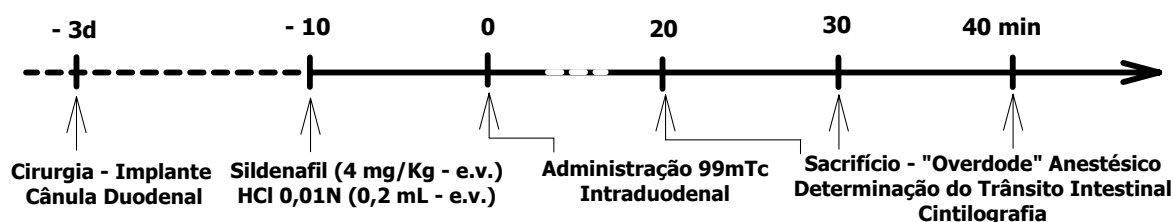


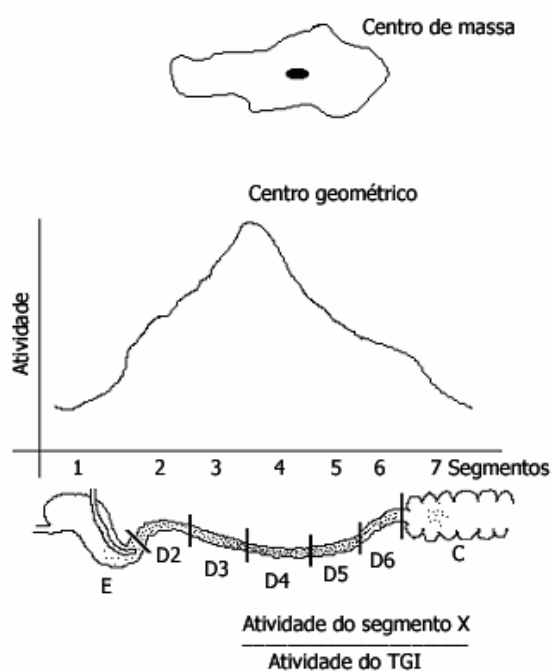
Figura 2.2.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil ou diluente sobre a taxa de trânsito intestinal de ratos acordados

Após a remoção do trato gastrointestinal, o mesmo foi estendido sobre uma prancha graduada em centímetros e o dividimos em sete segmentos consecutivos, a saber: estômago e o centímetro inicial do duodeno proximal (Segmento 1), cinco segmentos (~20cm) de delgado (doravante denominados: Segmentos 2, 3, 4, 5 e 6) e intestino grosso (Segmento 7). Cada um dos segmentos do TGI foi então acondicionado em dedais de látex.

A contagem da radiatividade que emanava de cada segmento foi determinada por meio de colimador de gama câmara (Simmens®) do Serviço de Medicina Nuclear do Instituto do Câncer do Ceará.

O somatório das contagens obtidas nos sete segmentos do TGI de cada rato permitiu-nos obter a radiatividade gastrointestinal total, bem como o cálculo da retenção fracional de cada segmento, expressa como percentagem em relação a este total.

O trânsito intestinal da refeição foi estimado de acordo com o método do *centro geométrico* (Miller *et al.*, 1981). De acordo com este princípio, obtivemos o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago, delgado 2, delgado 3, delgado 4, delgado 5, delgado 6 e cólon) pelo dígito identificador do respectivo segmento: (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente). A somatória destes valores indica o centro geométrico da refeição radiativa propelida ao longo do intestino, aos moldes do centro de massa dos objetos (Figura 2.2.2).



$$\text{Atividade do TGI} = 1x\text{E} + 2x\text{D2} + 3x\text{D3} + 4x\text{D4} + 5x\text{D5} + 6x\text{D6} + 7x\text{C}$$

Figura 2.2.2: Representação esquemática do estudo cintilográfico da progressão intestinal de uma refeição teste em ratos acordados.

Obtivemos a radiatividade gastrointestinal total, pelo somatório das contagens dos segmentos (estômago, delgado *ii*, *iii*, *iv*, *v*, *vi* e cólons), sendo a retenção fracional de cada segmento expressa como a percentagem desse total. O somatório dos valores do produto entre a retenção fracional de cada segmento pelo seu dígito identificador (respectivamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) determina a posição do centro geométrico da refeição. (Adaptada de: Santos, 1997)

A comparação estatística dos dados foi realizada utilizando-se a ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Já a comparação inter-grupo dos resultados foi feita mediante o teste “t” de Student (Bland, 1995).

Após a determinação da radiatividade das carcaças remanescentes, os animais e as vísceras foram empacotados em sacos

plásticos e acondicionados temporariamente no depósito de lixo radiativo do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

2.2.4 – Resultados de TI

Na figura 2.2.3 e 2.2.4 observamos os valores relativos ao centro geométrico da refeição e os percentuais de radiatividade encontrados nos segmentos do TGI.

A figura 2.2.3 mostra a distribuição do isótopo radiativo ao longo do TGI dos animais tratados com sildenafil ou diluente. Os valores de centro geométrico da refeição foram menores ($p < 0,05$) nos animais tratados com sildenafil ($2,8 \pm 0,2$; $3,0 \pm 0,2$ e $3,4 \pm 0,2$) quando comparados aos valores encontrados nos animais do grupo controle ($3,3 \pm 0,1$; $3,7 \pm 0,2$ e $4,2 \pm 0,2$), estudados respectivamente aos 20, 30 ou 40min pós-prandiais.

Nos animais sacrificados aos 20min após a refeição, o grande montante do marcador ficou retido entre os segmentos 2 e 3 para os ratos tratados com sildenafil ($n=9$) enquanto no grupo controle ($n=11$) não só houve maior retenção entre os segmentos 3 e 4 como pôde-se ainda encontrar marcador nos segmentos 5 e 6 do TGI, fato não observado nos animais tratados com sildenafil (Figura 2.2.3).

Já nos animais sacrificados aos 30min após a refeição, o grande montante do marcador ficou retido no segmento 3 (2a. parte do duodeno) nos ratos tratados com sildeanfil ($n=6$) enquanto no grupo controle ($n=6$) não somente houve uma maior retenção no segmento 4 (3a. parte do duodeno) como observamos a presença do marcador nos segmentos 5 e 6, fato não observado nos animais tratados com sildenafil (Figura 2.2.3).

E por fim, nos animais sacrificados aos 40min após a refeição, a maior parte da refeição ficou retida entre os segmentos 3 e 4 (3a. parte do duodeno) nos ratos tratados com sildenafil ($n=6$) enquanto no grupo controle ($n=6$) observamos maior retenção nos segmento 4 e 5 (4a. parte do duodeno), bem como detectamos marcador nas porções distais do intestino

delgado (Segmentos 5 e 6), fato não verificado nos animais tratados com sildenafil (Figura 2.2.3).

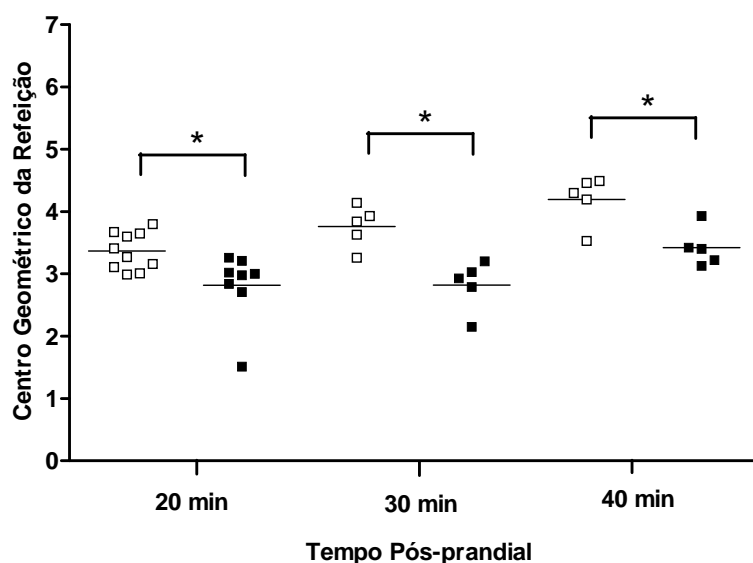


Figura 2.2.3 - Efeito do sildenafil (4mg/Kg, e.v. - ■) ou diluente (0,2mL HCl 0.01N, e.v. - □) sobre a distribuição do centro geométrico da refeição teste em ratos acordados.

Dez minutos após tratamento com sildenafil ou veículo, alimentamos os animais com refeição teste (10MBq de ^{99m}Tc ligada a fitato em 1ml de salina) injetada no duodeno. Decorridos 20, 30 ou 40min, sacrificamos os ratos e determinamos a contagem radiativa de cada segmento

do TGI [estômago (1), intestino delgado (2, 3, 4, 5 e 6) e cólon (7)]. A progressão da refeição se prestou para a determinação do centro geométrico da refeição, índice do trânsito intestinal. Os dados estão representados na forma de "scatter" com a linha horizontal representando a mediana. *, $p < 0,05$ (teste "t" de Student) grupo tratado vs grupo controle.

A figura 2.2.4 mostra a progressão da refeição teste ao longo do TGI nos ratos dos grupos controle e tratados, estudados aos 40min pós-prandiais. Nos animais tratados com sildenafil, verificamos retenção acentuada da refeição teste nos segmentos mais proximais do TGI (delgado 2 e 3) quando comparados aos animais do grupo controle. Em ambos os grupos, houve detecção de marcador radiativo no segmento 1 (estômago), provavelmente devido ao refluxo duodeno-gástrico decorrente da administração enteral da refeição.

Podemos observar que o tratamento com sildenafil induziu diminuição ($p < 0,05$) da PA em relação ao período basal ($100,2 \pm 3,0$ vs $78,0 \pm 3,0$ mmHg). Este efeito foi, entretanto, fugaz, pois por ocasião da gavagem, os valores de PA apresentavam diferença mínima em relação ao período basal ($85,9 \pm 1,8$ mmHg, $p < 0,05$), retomando níveis similares aos basais ao longo dos 20, 30 e 40min pós-prandiais ($96,2 \pm 3,0$; $97,3 \pm 3,5$ e $98,2 \pm 3,0$ mmHg).

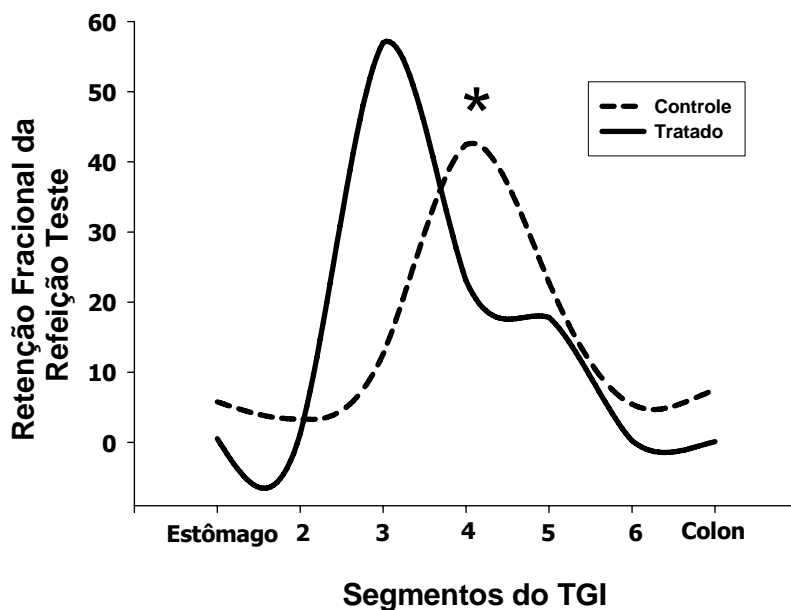


Figura 2.2.4 – Perfis da progressão gastrointestinal da refeição teste de ratos acordados, tratados com sildenafil (4mg/kg) ou veículo (HCl 0,01N) e estudados 40min após a gavagem.

Inicialmente os animais foram tratados (0,2mL – e.v.) com sildenafil ou veículo, recebendo 10min após, a refeição teste (10MBq de ^{99m}Tc ligado à fitato em 1mL de salina) injetada no duodeno. Decorridos 40min, os ratos foram sacrificados e a contagem radiativa de

cada segmento do TGI [estômago, intestino delgado (2, 3, 4, 5 e 6) e cólon] determinada numa gama câmara. Valores individuais da retenção (%) em cada segmento foram obtidos pela relação entre a contagem da radiatividade de cada segmento e o somatório da radiatividade de todos os segmentos. Os perfis representam valores médios obtidos em cada segmento para os grupos controle e tratado. *, $p < 0,05$ (teste "t" de Student) tratado vs controle.

2.3 - Estudo III - Efeito do citrato de sildenafil sobre a complacência gástrica de ratos anestesiados:

2.3.1 - Procedimentos cirúrgicos.

Inicialmente acondicionamos os animais (n=39) - ratos Wistar machos pesando entre 250-300g - em gaiolas individuais e os mantivemos em jejum por 24h, mas com livre acesso a água até 2h horas antes dos experimentos.

Após anestesia com uretana (1,2g/kg, I.P.), submetemos os animais a traqueostomia, seguida da inserção de cânula traqueal, de modo a facilitar a ventilação espontânea. Em seguida, inserimos cânulas de polietileno (PE 50), plenas de solução salina 0,9% e heparina (500U/mL) na veia jugular e na artéria carótida direitas. Destinamos a veia para administração de drogas ou veículo enquanto empregamos a artéria para registro da PA.

2.3.2 - Medida do volume gástrico (VG)

Para a monitoração do volume gástrico, utilizamos o modelo pletismométrico que desenvolvemos e validamos (Graça *et al.*, 2000). Inicialmente introduzimos *per os*, com o auxílio de guia metálico, um catéter de polietileno (DE=2,0mm/DI=1,5mm) tendo na extremidade balão flácido de látex (volume ~ 4mL), o qual foi posicionado cuidadosamente no estômago proximal. Em seguida, conectamos a extremidade livre do catéter à base de um reservatório em "U" (DI= 2,5cm, capacidade máxima de 30mL). O reservatório, a sonda gástrica e o balão flácido foram então preenchidos com solução condutora padrão [45mg% de NaCl e 0,3mL% de polietilenoglicol (Imbebiente BBC Ornano®)] a 37°C.

Graças a este sistema de vasos comunicantes, variações no tônus gástrico capazes de modificar o volume líquido no balão e assim alterarem o conteúdo do reservatório, são detectadas por um sensor eletrônico de volume e registradas continuamente pelo pletismômetro (Ugo

Basile®, Comerio, Itália). Dada a pressão constante do sistema, variações no tônus gástrico e por sua vez do VG, foram tidas como variações da complacência gástrica.

No início de cada experimento, o estômago foi submetido a distensão por uma pressão de 4cmH₂O mediante a elevação do nível líquido do reservatório até 4cm acima do apêndice xifóide do animal. A seguir, permitiu-se o livre equilíbrio das pressões no interior do sistema sendo anotado o volume resultante do reservatório, doravante chamado de VG inicial (em ml). As variações subsequentes foram monitoradas continuamente, as quais acrescidas do valor do VG inicial e anotados manualmente a cada 30s foram expressas em mL.

2.3.3 – Monitoração da pressão arterial

A monitoração da PA foi obtida pela conexão da cânula carotídea a um transdutor de pressão (ML, AD Instruments®), acoplado a um sistema de aquisição de sinais biológicos (PowerLab- ADInstrumesnts®) com registro contínuo em microcomputador.

2.3.4 - Protocolos experimentais

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em repouso por 30min para a estabilização das condições hemodinâmicas. Todos os animais foram monitorados por um período total de pelo menos 50min, sendo os 20min iniciais de monitoração considerados como período Basal. A seguir, os animais foram distribuídos em um dos protocolos experimentais seguintes:

2.3.4.1 - Efeito do sildenafil sobre o volume gástrico (VG)

Após o período basal, os animais receberam injeção (0,2mL - e.v.) de sildenafil (3mg/kg - n=7) ou veículo (HCl 0,01N - n=5). Os valores de VG e PA obtidos nos 30min finais foram agrupados em 3 intervalos iguais e consecutivos de 10min, a saber: (Sil₁₀, Sil₂₀ e Sil₃₀ ou HCl₁₀, HCl₂₀ e HCl₃₀, respectivamente) (Figura 2.3.1).

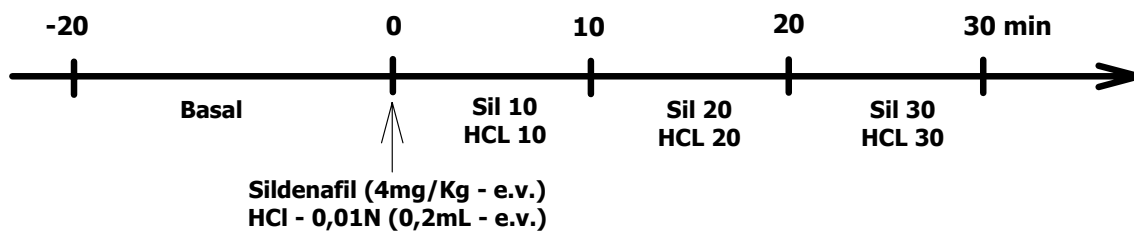


Figura 2.3.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil ou veículo sobre o volume gástrico de ratos anestesiados

2.3.4.2 - Participação de vias regulatórias do fenômeno.

Neste conjunto de experimentos, estudamos os animais submetidos aos pré-tratamentos cirúrgico (denervação por esplancnotomia) ou farmacológicos, seja com β -bloqueador (propranolol), inibidor da NO-sintetase: nitro-arginina (L-NNA), doador de NO (nitroprussiato de sódio - NPS); ou ainda, um inibidor inespecífico da guanilato ciclase (azul de metileno - AM).

2.3.4.2.1 – Esplancnotomia

Inicialmente, mantivemos os animais (n=5) desse sub-grupo em jejum, com livre acesso à água, por 16h. Sob anestesia inalatória com éter, realizamos laparotomia mediana onde identificamos, com ajuda de lente de aumento de 10X, o glândulo celíaco e os nervos mesentéricos, os quais foram a seguir seccionados (Taché *et al.*, 1987). Nas 24h subsequentes, mantivemos os animais em caixas individuais sob jejum mas com livre acesso a solução de reidratação oral (NaCl 3,5g, KCl 1,5g, Citrato de Sódio 2,9g e Glicose 20g/L). Doravante, o estudo do efeito do sildenafil sobre a complacência gástrica seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente (Figura 2.3.2).

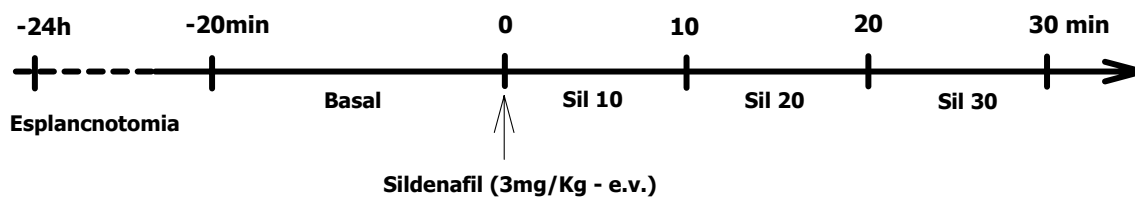


Figura 2.3.2 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil sobre o volume gástrico e pressão arterial de ratos anestesiados, estudados cerca de 24h após esplancnotomia.

2.3.4.2.2 - Drogas

Nos estudos farmacológicos do aumento da complacência gástrica pelo sildenafil, os animais foram estudados sob o efeito de agonistas ou antagonistas da transmissão neuro-autônômica.

Após o período basal (20min), um conjunto de animais recebeu como pré-tratamento injeção e.v. de propranolol (2mg/kg, n=6), de nitro-arginina (L-NNA) (3mg/kg, n=5) ou de azul de metileno (AM) (3mg/kg, n=5). Decorridos 20min, tratamos estes animais com sildenafil (3mg/Kg). Os valores de VG e PA obtidos nos 30min finais, foram agrupados em três intervalos consecutivos de 10min, chamados respectivamente de Sil₁₀, Sil₂₀ e Sil₃₀ (Figura 2.3.3).

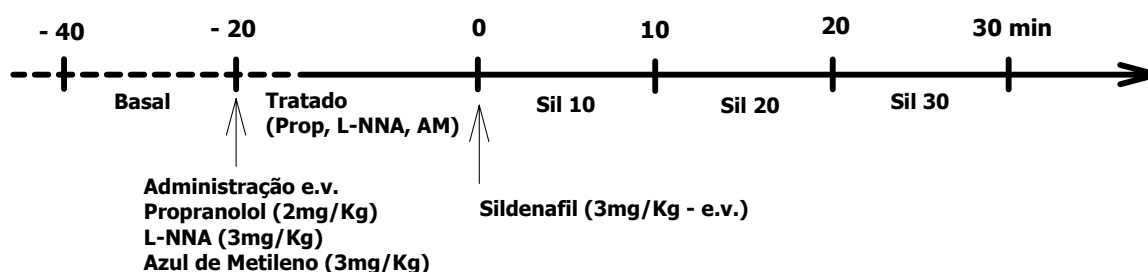


Figura 2.3.3 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil sobre o volume gástrico e sobre a pressão arterial de ratos anestesiados e pré-tratados com propranolol, L-NNA ou Azul de Metileno.

Em outro grupo de animais (n=6), decorridos o período basal (20min) e logo após 10min a injeção de sildenafil (3mg/Kg), administramos nitroprussiato de sódio (NPS) (1mg/Kg, e.v.). Em seguida, monitoramos as variações do VG e da PA por mais 30min, sendo estes valores agrupados em três intervalos iguais e consecutivos de 10min, chamados de (NPS₁₀, NPS₂₀ e NPS₃₀) (Figura 2.3.4).

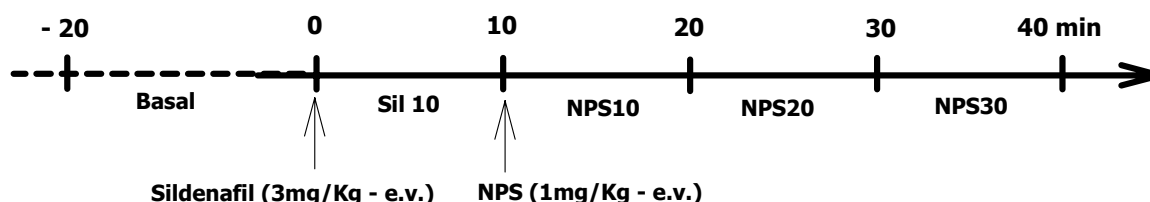


Figura 2.3.4 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil sobre o volume gástrico e a pressão arterial de ratos anestesiados e pós-tratados com nitroprussiato de sódio (NPS).

2.3.5 - Avaliação experimental

Ao final de cada experimento, todos os animais sofreram, ainda em plano anestésico, laparotomia mediana para inspeção do posicionamento do balão, sendo a seguir sacrificados por injeção e.v. de solução concentrada de KCl. Descartamos os dados obtidos de animais com localização anômala do balão.

2.3.6 - Análise estatística

Os valores individuais do VG e da PA dos diversos grupos experimentais estão expressos no texto na forma de média \pm EPM. A análise de variância (“One way – ANOVA”) seguida do teste de Dunnett foi usada para comparar as diferenças entre as médias dos diversos períodos experimentais, bem como entre os grupos estudados. Diferenças com $p < 0,05$ foram tidas como significativas (Bland, 1995).

2.3.7 – Resultados de complacência gástrica

A figura 2.3.5 mostra as variações do volume gástrico (VG) e da pressão arterial (PA) secundárias à injeção de sildenafil ou diluente. No painel A podemos observar aumento do volume gástrico, o qual foi significativo aos 10, 20 e 30min após o tratamento com sildenafil quando comparado ao respectivo valor basal ($3,1 \pm 0,2$; $3,1 \pm 0,2$ e $3,1 \pm 0,2$ mL, vs $2,9 \pm 0,2$ mL). A PA também apresentou queda significativa após a administração de sildenafil, mantendo-se assim durante os 30min de monitoração ($59,8 \pm 3,2$; $64,8 \pm 3,7$ e $59,3 \pm 4,6$ mmHg, respectivamente vs $105,8 \pm 2,3$ mmHg).

No painel B, podemos observar que a administração do veículo não modificou os valores de VG em relação ao período basal ($3,6 \pm 0,5$; $3,5 \pm 0,5$ e $3,4 \pm 0,4$ vs $3,5 \pm 0,5$ mL) embora tenha ocasionado hipotensão transitória nos 10min iniciais ($90,5 \pm 5,6$ vs $102,2 \pm 5,7$ mmHg, $p < 0,05$), a PA retomou níveis similares aos do controle nos 20 e 30min subsequentes ($97,8 \pm 6,7$ e $98,7 \pm 5,7$ mmHg, $p > 0,05$).

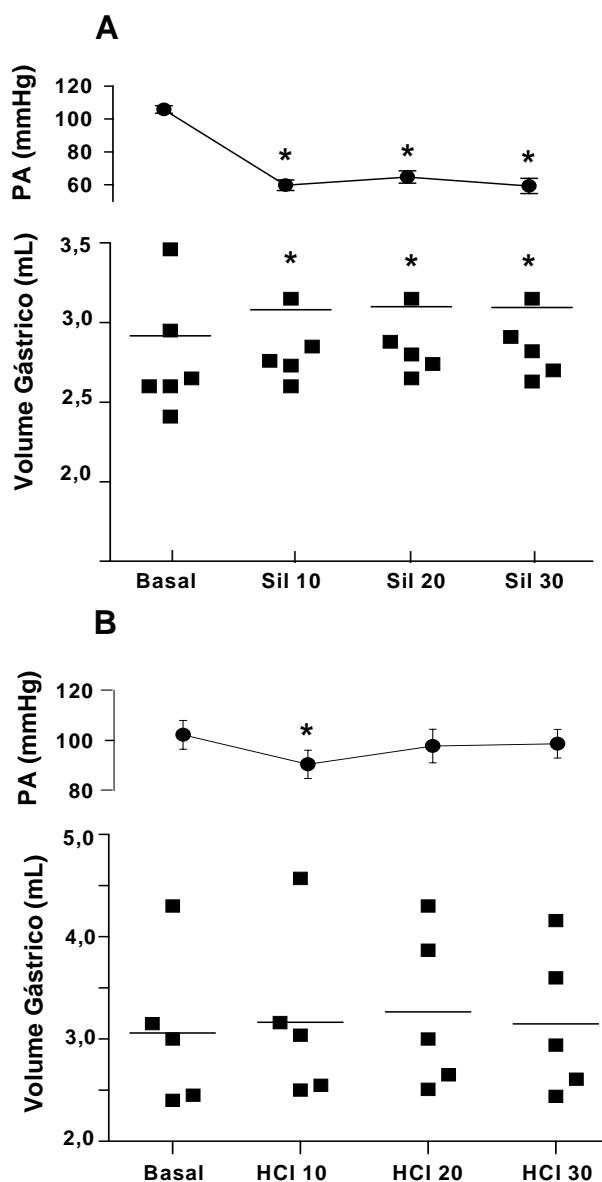


Figura 2.3.5: Efeitos do sildenafil ou diluente (HCl) sobre a pressão arterial (PA, em mmHg) e volume gástrico (VG, em mL) de ratos anestesiados.

Após um período basal de 20min, tratamos os animais (0,2mL - e.v.) com sildenafil (3mg/Kg, n=7 – painel A) ou diluente (HCl 0,01N – painel B). Os valores de VG e PA monitorados nos 30min subsequentes foram agrupados em três intervalos consecutivos de 10min (Sil 10, Sil 20, Sil 30 ou HCl 10, HCl 20, HCl 30, respectivamente). Os dados do VG obtidos por meio de um sistema barostato estão representados na forma de "scatter" com a linha horizontal representando a mediana. Os círculos fechados e as linhas verticais representam a média±EPM da PA, respectivamente. *, $P < 0,05$ vs período basal (ANOVA e teste de Dunnett).

Na Figura 2.3.6 (painel A), observamos o efeito do pré-tratamento com L-NNA sobre o relaxamento gástrico induzido pelo sildenafil. Após o período basal ($2,6 \pm 0,1$ mL) a administração de L-NNA não modificou os níveis de VG ($2,5 \pm 0,2$ mL). Por outro lado, observamos diminuição ($p < 0,05$) do VG aos 30min após o tratamento com sildenafil ($2,4 \pm 0,2$ mL). Quando comparada ao período basal, o pré-tratamento com L-NNA aumentou a PA ($136,1 \pm 11,4$ vs $109,5 \pm 9,1$ mmHg, $p < 0,05$), retornando aos níveis basais nos 10, 20 e 30min após a administração de sildenafil ($102,1 \pm 9,4$, $112,9 \pm 10,2$ e $110,1 \pm 11,4$ mmHg, respectivamente).

Na Figura 2.3.6 (painel B) observamos o efeito do pós-tratamento com nitroprussiato de sódio (NPS) sobre as variações do VG e da PA nos animais previamente tratados com sildenafil. O VG aumentou ($p < 0,05$) após o tratamento com sildenafil quando comparado aos valores basais ($2,6 \pm 0,1$ vs $2,4 \pm 0,1$ mL). O tratamento com NPS promoveu aumento ($p < 0,05$) adicional do VG aos 10, 20 e 30min ($2,8 \pm 0,2$; $2,7 \pm 0,2$ e $2,7 \pm 0,1$ mL, respectivamente) quando comparado aos níveis basais ($2,4 \pm 0,1$ mL). Tomando-se como referência os valores basais da PA ($112,5 \pm 5,3$ mmHg), o sildenafil provoca significativa hipotensão arterial ($70,1 \pm 4,8$ mmHg), fenômeno que se acentua nos 10min subsequentes ao tratamento com NPS ($48,0 \pm 2,0$ mmHg), minorando posteriormente nos 20 e 30min ($75,7 \pm 12,5$ e $80,2 \pm 13,4$ mmHg, respectivamente) (Fig. 2.3.6-B).

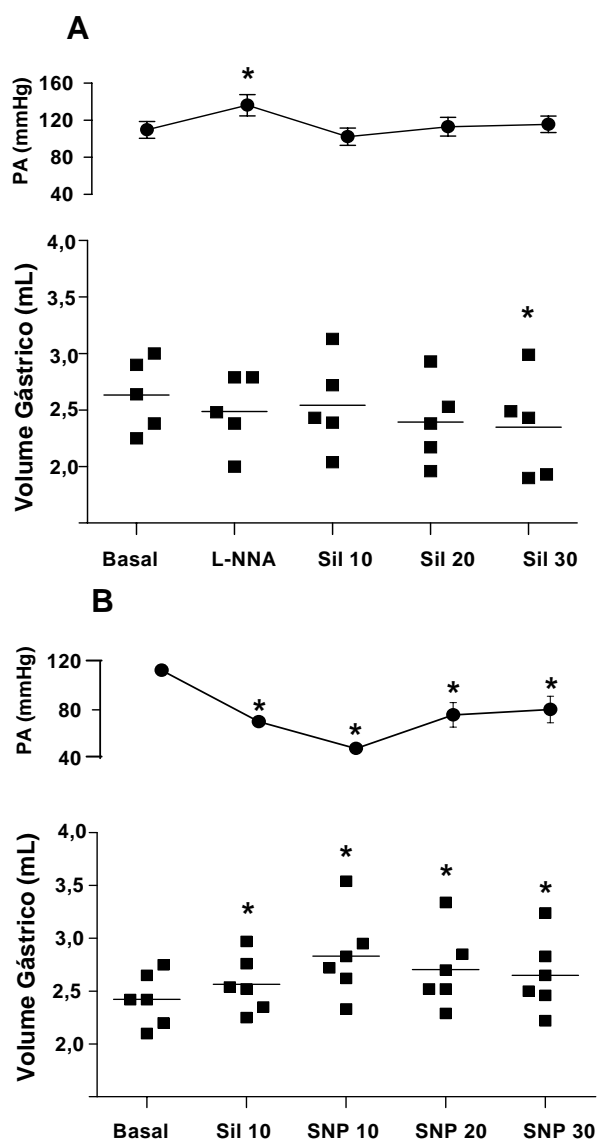


Figura 2.3.6 - Efeitos do pré-tratamento com Nitro-arginina (L-NNA) e do pós-tratamento com Nitroprussiato de sódio (NPS) sobre os efeitos do sildenafil na pressão arterial média (PA, em mmHg) e volume gástrico (VG, em mL) em ratos anestesiados.

No Painel A, após os 20min iniciais de monitoração (período Basal), os animais ($n=5$) receberam injeção e.v. de L-NNA (3mg/Kg) (período L-NNA). Após 20min, os animais foram tratados com sildenafil (3mg/Kg , e.v.). Os valores de PA e VG foram monitorados por 30min, os quais foram agrupados em três intervalos consecutivos de 10min (Sil 10, Sil 20, Sil 30). No painel B, após os 20min iniciais de monitoração (período Basal), os animais ($n=6$) receberam injeção e.v. de sildenafil (3mg/Kg , e.v.). Decorridos 10min (período Sil), foram tratados com NPS (1mg/Kg , e.v.). Os valores de PA e VG obtidos nos 30min subsequentes foram agrupados em três intervalos consecutivos de 10min (NPS 10, NPS 20, NPS 30). Os dados de VG obtidos por meio de sistema barostato estão representados na forma de "scatter", com a linha horizontal representando a mediana. Círculos fechados e linhas verticais representam a média \pm EPM da PA, respectivamente. *, $P < 0,05$ vs período basal (ANOVA e teste de Dunnett).

Na Figura 2.3.7 observamos o efeito do pré-tratamento com azul de metileno (AM) no relaxamento do estômago e hipotensão induzidos pelo sildenafil. Após o período basal, o tratamento com AM não modificou *per se* os valores de VG ($2,4\pm 0,2$ vs $2,4\pm 0,1$ mL). Contudo, o tratamento com sildenafil tendeu a diminuir o VG nos 10min iniciais ($2,3\pm 0,1$ mL), alcançando valores menores aos 20 e 30min ($2,1\pm 0,1$ e $2,0\pm 0,1$ mL, $p<0,05$, respectivamente). A PA esteve diminuída 10min após o tratamento com sildenafil ($85,3\pm 10,1$ mmHg, $p<0,05$) quando comparada ao período AM ($101\pm 2,9$ mmHg), retomando a níveis similares aos basais, respectivamente aos 20 e 30min após o tratamento com sildenafil ($102,2\pm 3,3$ e $103\pm 4,7$ mmHg, $p>0,05$).

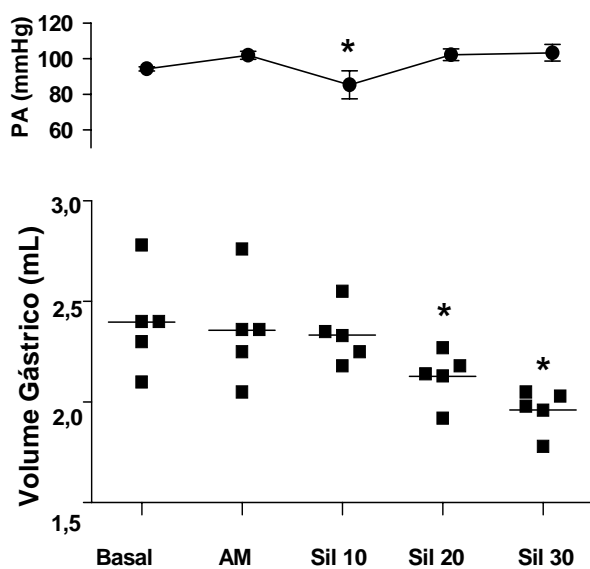


Figura 2.3.7 - Efeito do pré-tratamento com Azul de Metileno (AM) sobre a pressão arterial média (PA, em mmHg) e o volume gástrico (VG, em mL) de ratos anestesiados e tratados com sildenafil.

Após os 20min iniciais de monitoração (período Basal), os animais ($n=5$) foram pré-tratados com AM (3mg/Kg – e.v.) (período AM). Após 20min, os ratos receberam injeção de sildenafil (3mg/Kg, e.v.) e os dados obtidos nos 30min subsequentes agrupados em intervalos consecutivos de 10min (Sil 10, Sil 20, Sil 30). Os valores de VG obtidos por pletismografia estão indicados na forma de "scatter" com a linha horizontal representando a mediana. Círculos fechados e linhas verticais representam média ± EPM da PA, respectivamente. *,

$P<0,05$ vs período basal (ANOVA e teste de Dunnett).

Na figura 2.3.8 (painel A) observamos o efeito do pré-tratamento com propranolol sobre o fenômeno de relaxamento gástrico induzido pelo sildenafil. Após o período basal, a injeção de propranolol não modificou os valores de VG ($2,8\pm 0,4$ vs $2,9\pm 0,4$ mL). Por outro lado, a administração de sildenafil tendeu a diminuir o VG, alcançando valores significativamente menores aos 20 e 30min ($2,5\pm 0,34$ e $2,2\pm 0,3$ mL, respectivamente). O pré-tratamento com propranolol ($106,0\pm 10,1$ mmHg) bem como o sildenafil ($89,1\pm 10,6$ mmHg), não modificaram de forma significativa os níveis de PA

desse grupo de animais quando comparados aos valores basais ($104,2\pm 3,7\text{mmHg}$), permanecendo sem alterações significativas nos 20min posteriores à administração de sildenafil ($103,1\pm 9,4$ e $101,5\pm 9,5\text{mmHg}$).

Na figura 2.3.8 (painel B) observamos o efeito do pré-tratamento cirúrgico por esplancnotomia no relaxamento do estômago induzido pelo sildenafil. Comparado aos níveis basais ($3,2\pm 0,2\text{mL}$) o sildenafil aumentou ($p<0,05$) os valores de VG ($3,5\pm 0,1\text{mL}$) logo após os 10min da injeção do fármaco, retornando para níveis similares aos basais nos 20min após o tratamento ($3,2\pm 0,3\text{mL}$), e diminuindo significativamente esses valores nos 30min após a injeção ($2,9\pm 0,2\text{mL}$). Já a hipotensão arterial induzida pelo sildenafil se manteve durante todo período experimental ($57,6\pm 2,8$; $62,5\pm 3,4$ e $65,4\pm 4,3\text{mL}$ respectivamente aos 10, 20 e 30min vs $102,4\pm 2,3\text{mL}$ período basal, $p<0,05$).

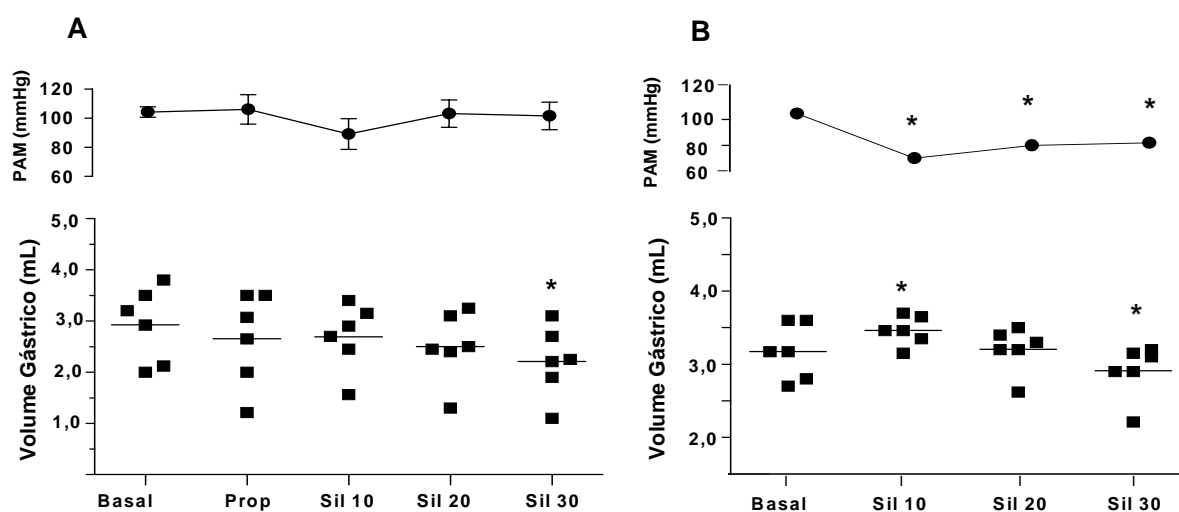


Figura 2.3.8 - Efeito do pré-tratamento farmacológico (propranolol) ou cirúrgico (esplancnotomia) sobre a pressão arterial média (PA, em mmHg) e o volume gástrico (VG, em mL) em ratos anestesiados e tratados com sildenafil.

No painel A, após os 20min iniciais de monitoração (período Basal), os animais ($n=6$) foram pré-tratados com propranolol (2mg/Kg - e.v.) (período Prop). Após 20min, os animais receberam injeção de sildenafil (3mg/Kg , e.v.) e os valores de PA e VG obtidos nos 30min subsequentes foram agrupados em três intervalos consecutivos de 10min (Sil 10, Sil 20, Sil 30). No painel B, em animais previamente submetidos à esplancnotomia monitoramos o VG e a PA por 20min (período Basal). Em seguida, os animais receberam injeção de sildenafil (3mg/Kg , e.v.), sendo os valores de PA e VG obtidos nos 30min subsequentes agrupados em três intervalos consecutivos de 10min (Sil 10, Sil 20, Sil 30). Dados de VG obtidos por sistema barostato estão representados na forma de "scatter", com a linha horizontal representando a mediana. Círculos fechados e linhas verticais representam média ± EPM da PA, respectivamente. *, $P<0,05$ vs período basal (ANOVA e teste de Dunnett).

2.4 – Estudo IV- Efeito do citrato de sildenafil sobre a contratilidade de tiras isoladas do duodeno de ratos *ex vivo*.

2.4.1 - Animais e preparação das tiras

Neste estudo, utilizamos 28 ratos Wistar machos (180-250g), sacrificados por deslocamento cervical. Após exsanguinação, o duodeno proximal foi isolado e dissecado, em seguida transferido para uma placa de Petri contendo solução fisiológica padrão (Tyrode). Após limpeza do lúmen intestinal por injeção com solução de Tyrode e dissecação do mesentério, tiras isoladas do duodeno foram preparadas a partir dos segmentos. As tiras foram cortadas transversalmente em pequenos segmentos (~ 0.5cm de comprimento).

Em seguida, as tiras foram suspensas longitudinalmente em cubas de vidro (com capacidade de 10mL), preenchidas com solução de Tyrode, mantidas sob 37°C e pH 7,4, sendo continuamente aeradas com ar ambiente. Uma das extremidades das tiras foi ancorada a uma haste de metal fixa no fundo da cuba enquanto a extremidade livre foi conectada a um transdutor de força (Grass modelo FT.03).

Inicialmente aplicamos uma tensão de 1g às preparações, as quais foram mantidas em repouso por um período de 1h a guiza de equilíbrio e estabilização. A tensão exercida pela contratilidade de cada tira foi monitorada por um sistema de aquisição de dados (Dataq Instruments, modelo DI200, Akron, OH, USA) e registrada continuamente (20Hz) em microcomputador.

2.4.2 - Soluções e drogas empregadas

A solução fisiológica padrão — solução de Tyrode — foi preparada de modo a conter: NaCl 136.0, KCl 5.0, MgCl₂ 0.98, CaCl₂ 2.0, NaH₂PO₄ 0.36, NaHCO₃ 11.9 e glicose 5.5 mM. As drogas utilizadas [1H-(1,2,4)-oxadiazole-(4,3-a)-quinoxalin-1-one] (ODQ), azul de metilino (AM), zaprinaste, papaverina, acetilcolina, carbacol e forskolina foram todas

compradas junto à Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Já o sildenafil foi gentilmente cedido pela Pfizer®. Todas as soluções foram obtidas adicionando-se a substância pura à solução de Tyrode e em seguida estocadas a 4°C em concentrações de 100 a 1000 vezes maiores àquelas existentes na cuba.

2.4.3 - Protocolos experimentais

Em um grupo de experimentos (n=9), obtivemos uma curva do tipo dose resposta mediante a adição de doses crescentes e cumulativas de sildenafil (0,1 a 300µmol/L) ao banho, com intervalo de 5min entre cada concentração ou de 10min quando necessário até a observação de resposta platô. Utilizando o mesmo protocolo, examinamos também os efeitos do zaprinaste e da papaverina, sob concentrações iguais àquelas empregues com o sildenafil (Figura 2.4.1).

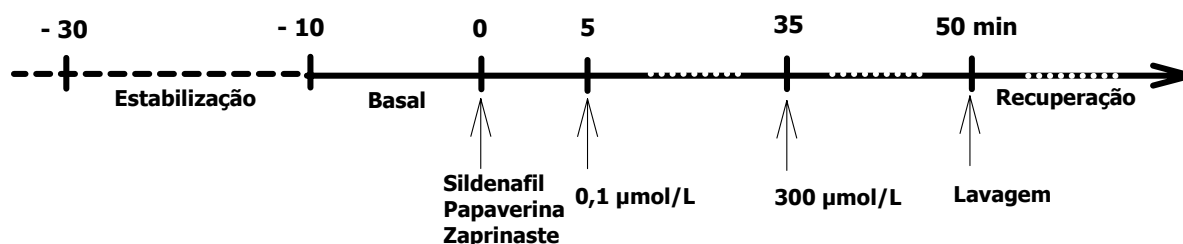


Figura 2.4.1 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do sildenafil, da papaverina e do zaprinaste (doses crescentes e cumulativas – 0,1 a 300µmol/L) sobre a amplitude e a freqüência das contrações espontâneas de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*.

Para avaliar o eventual efeito antiespasmódico do sildenafil, utilizamos tiras isoladas (n=6) de duodeno expostas durante 5min à doses crescentes e cumulativas de sildenafil (0,1 a 300µmol/L), sendo que para cada uma das concentrações de sildenafil era também adicionado acetilcolina (1µmol/L) ao banho. Ao final dos experimentos, os segmentos foram lavados com solução de Tyrode, esperando-se então, entre 5 a 10min, a recuperação espontânea do tônus da preparação (figura 2.4.2).

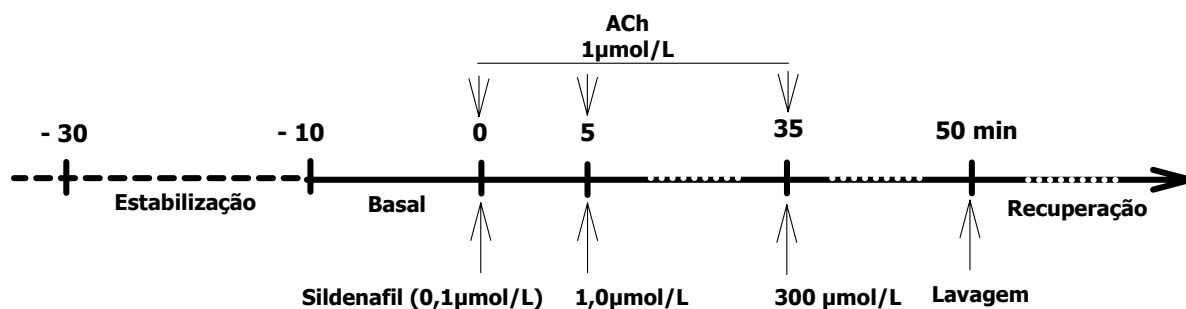


Figura 2.4.2 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito antiespasmódico do sildenafil sobre as contrações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo* induzidas por Acetilcolina (ACh).

Noutro grupo de experimentos (n=8) avaliamos o efeito mio-relaxante do sildenafil mediante a adição de concentrações crescentes e cumulativas de sildenafil (0,1 a 300µmol/L) em banhos contendo espécimes pré-contraídas com carbacol (1µmol/L) (Figura 2.4.3). A diferença nos valores de tensão correspondente a linha de base e o platô de cada contração na ausência e na presença de sildenafil foi tida como o efeito máximo desta droga e este índice considerado como o efeito relaxante do sildenafil.

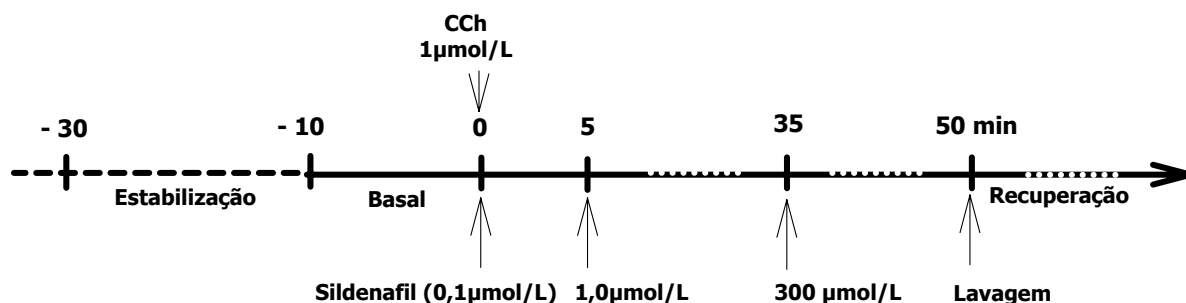


Figura 2.4.3 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo* induzidas por Carbacol (CCh).

Noutro conjunto de experimentos, avaliamos os efeitos de agonistas e antagonistas autonômicos sobre a propriedade miorelaxante do sildenafil. Para tanto, doses crescentes e cumulativas de sildenafil (0,1 a 300µmol/L) foram adicionadas a cada 5min sobre tiras isoladas de duodeno pré-tratadas com: inibidores da guanilato ciclase [azul de metileno (10µmol/L, n=11) e ODQ (10µmol/L, n=8)]; inibidor da NO-sintetase [L-NAME (10µmol/L, n=6) ou seu equivalente racêmico D-NAME (10µmol/L, n=7)] ou

ainda com o substrato para a NO-sintetase: L-arginina (10 μ mol/L, n=8) (Figura 2.4.4).

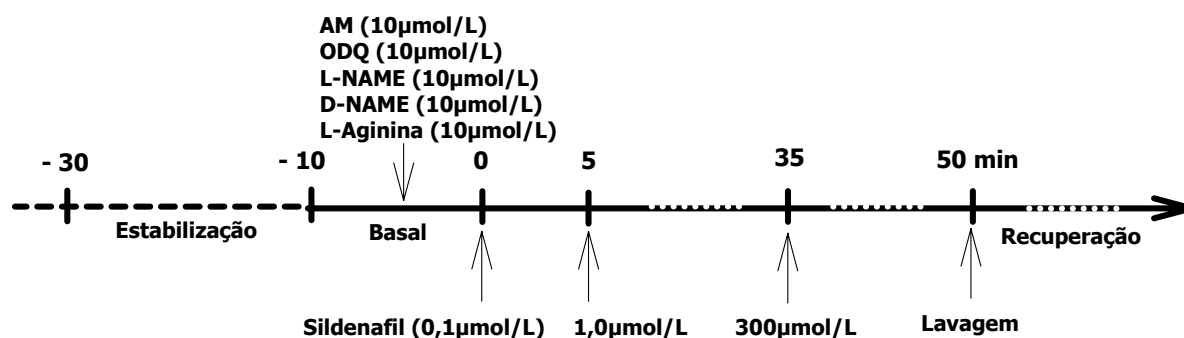


Figura 2.4.4 – Delineamento experimental utilizado para avaliação do efeito do pré-tratamento com azul de metileno (AM) (10 μ mol/L), ODQ (10 μ mol/L), L-NAME (10 μ mol/L), D-NAME (10 μ mol/L) e L-arginina (10 μ mol/L) sobre a propriedade mio-relaxante do sildenafil (doses crescentes e cumulativas – 0,1 a 300 μ mol/L) observada em tiras isoladas de duodeno de ratos *ex vivo*.

Ao final de cada experimento, os segmentos foram lavados repetidas vezes com solução de Tyrode de modo a avaliar a recuperação espontânea da contratilidade intestinal ao longo do período por até 1h. Os dados daqueles experimentos nos quais as tiras não apresentaram a recuperação espontânea da contratilidade foram descartados.

2.4.4 - Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo “n” o número de observações para cada protocolo experimental. Os dados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) seguida de testes estatísticos pertinentes para múltiplas comparações (conforme indicado nos resultados). As diferenças estatísticas com $p < 0,05$ foram tidas como significativas. Valores de EC_{50} e IC_{50} (i.e., a concentração do agonista ou do antagonista capaz de promover 50% da resposta observada) foram calculados por interpolação semi-logarítmica dos dados e estão dispostos no texto como média geométrica com intervalo de confiança de 95% (Bland, 1995).

2.4.5 – Resultados dos estudos de contratilidade *in vitro*.

2.4.5.1 - Efeitos antiespasmódico e mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações induzidas por acetilcolina e carbacol em tiras isoladas de duodeno de ratos.

O sildenafil mostrou importante efeito antiespasmódico sobre as contrações fásicas induzidas por acetilcolina em tiras isoladas de duodeno ($n = 7$) de ratos *ex vivo* de forma concentração dependente com o valor da IC_{50} correspondendo a 26,7 [15,6 – 57,6] $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,001$) (Fig 2.4.5, painéis a e b). Da mesma forma, o sildenafil promoveu o relaxamento ($p < 0,001$) de tiras duodenais ($n=8$) submetidas a contrações tônicas por carbacol, tendo como IC_{50} um valor de 16,2 [9,5 – 26,7] $\mu\text{mol/L}$ (Fig 2.4.5 painéis b e c).

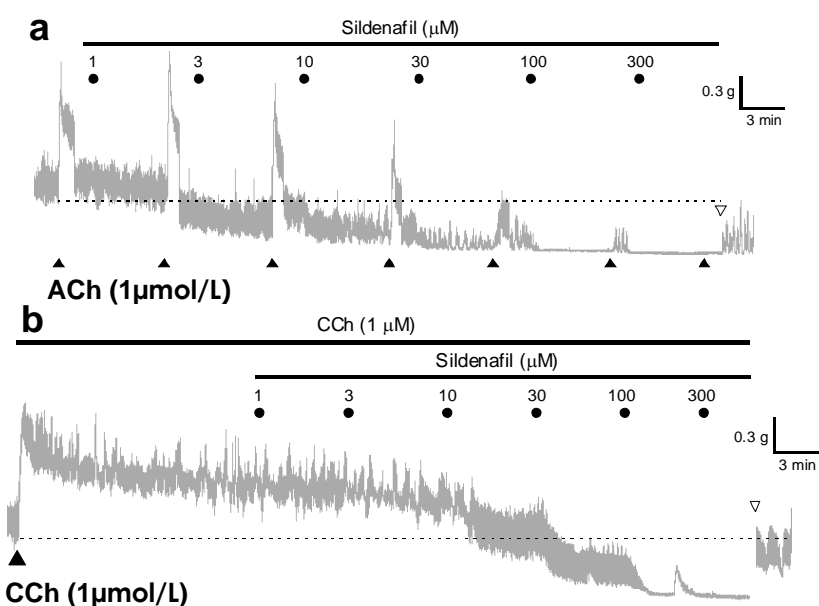


Figura 2.4.5 a e b – Efeito antiespasmódico e mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações induzidas por acetilcolina (ACh) e por carbacol (CCh) em tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*.

Traçado típico de experimento acerca do efeito do sildenafil sobre as contrações fásicas induzidas por acetilcolina (ACh) (painel a) e contrações tônicas induzidas por carbacol CCh (painel b) em tiras isoladas de duodeno de

rato. No painel a podemos observar na porção inferior triângulos cheios, que indicam o momento da administração de cada uma das doses de ACh (1 $\mu\text{mol/L}$) à intervalos de 5min. Já no painel b, o triângulo cheio indica o momento da administração do CCh (1 $\mu\text{mol/L}$) dose única. O tempo de exposição (5min) da preparação sob cada uma das doses de sildenafil (1 – 300 $\mu\text{mol/L}$), bem como o momento da adição destas, estão indicados por meio de círculos cheios na porção superior dos painéis a e b. A lavagem da preparação, visando à recuperação, está indicada por meio de triângulos vazios nas figuras a e b.

Vale salientar que o sildenafil foi capaz de produzir, nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{mol/L}$ relaxamento adicional das tiras isoladas de duodeno (correspondente a $25.2 \pm 8.1\%$ da contração induzida por

carbacol), ultrapassando o tônus basal da preparação (Fig. 2.4.5, painéis a e c). Ademais, tal efeito inibitório do sildenafil foi totalmente reversível em todas as preparações quando estas foram lavadas com a solução fisiológica padrão.

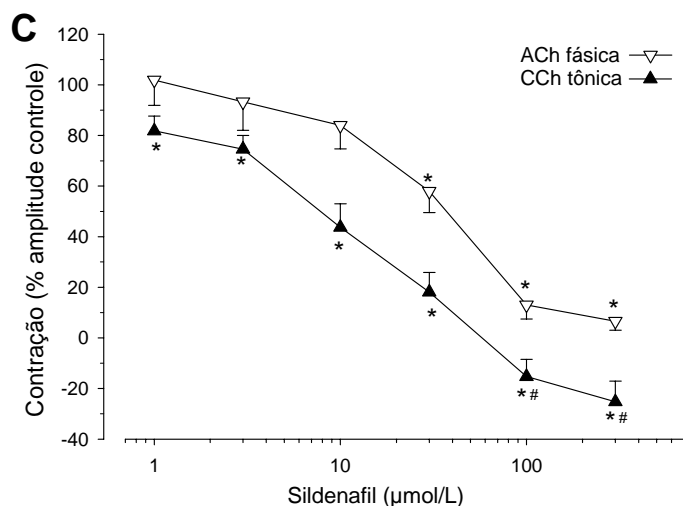


Figura 2.4.5 c – Efeito antiespasmódico e mio-relaxante do sildenafil sobre as contrações induzidas por acetilcolina (ACh) e por carbacol (CCh) em tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*.

O painel c apresenta os valores percentuais (média±EPM) de relaxamento das preparações, secundário ao sildenafil (1–300μmol/L), em relação ao controle, sobre as contrações induzidas por acetilcolina (triângulos vazios) ou carbacol (triângulos cheios) de tiras isoladas de duodeno de rato. *, p<0,05, comparado ao controle –

contração induzida pelo agonista (ACh ou CCh); #, p<0,05, comparado ao respectivo tônus basal (teste de Dunett).

2.4.5.2 – Efeito inibitório do sildenafil sobre a atividade contrátil espontânea de tiras isoladas de duodeno de rato

As tiras de duodeno exibiram atividade contrátil espontânea oscilatória com força média correspondendo a $496,2 \pm 43,1$ mg (n=46) numa frequência de $28,0 \pm 1,6$ contrações/min. Nas concentrações de 0,1 a 300μmol/L, o sildenafil reduziu, de forma concentração dependente, a amplitude das contrações (n=9) espontâneas com EC₅₀ de 9,6 [5,7–16,2]μmol/L, com efeito máximo sob 300μmol/L, na qual aboliu a atividade contrátil espontânea em todas as preparações estudadas.

Ademais, este efeito inibitório do sildenafil foi significativamente mais potente (p<0,05) quando comparado aos efeitos de outros conhecidos inibidores de fosfodiesterases, como o zaprinaste e a papaverina, os quais também diminuíram a atividade contrátil espontânea das tiras de duodeno

com valores de EC_{50} de 91,6 [46,0 – 182,2] (n=8) e 78,5 [37,1 – 166,3] $\mu\text{mol/L}$ (n=6), respectivamente (Figura – 2.4.6).

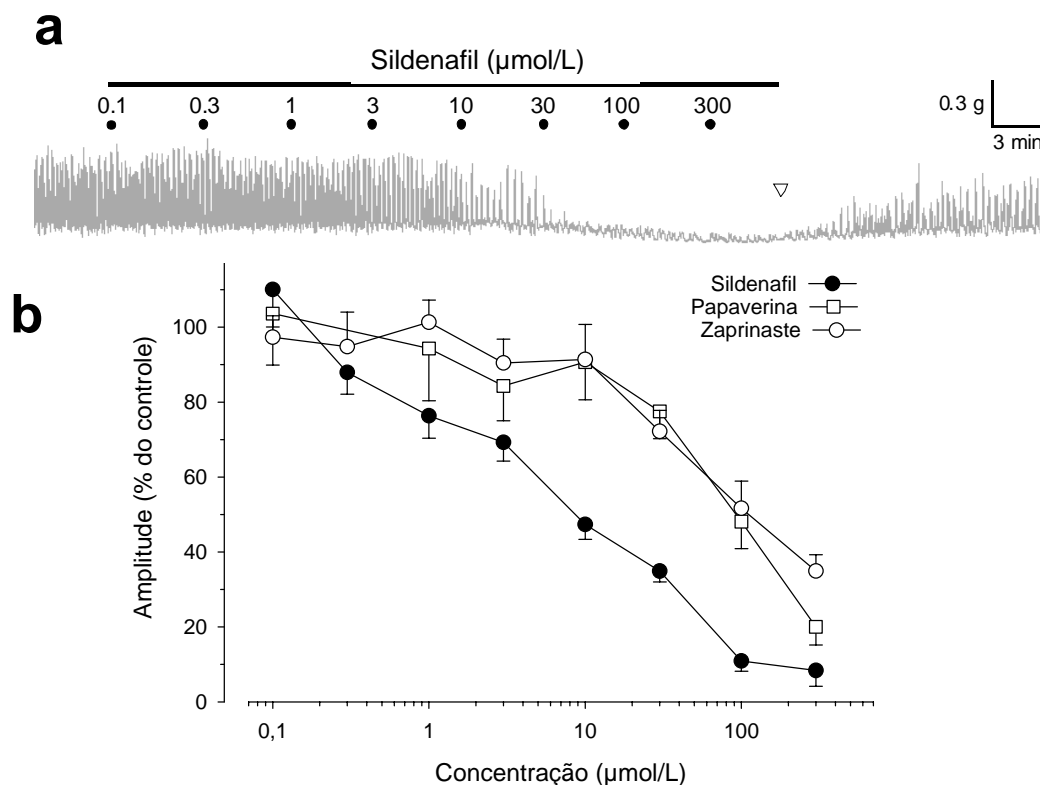


Figura 2.4.6 – Efeito inibitório do sildenafil, da papaverina e do zaprinaste sobre as contrações espontâneas de tiras isoladas de duodeno de rato.

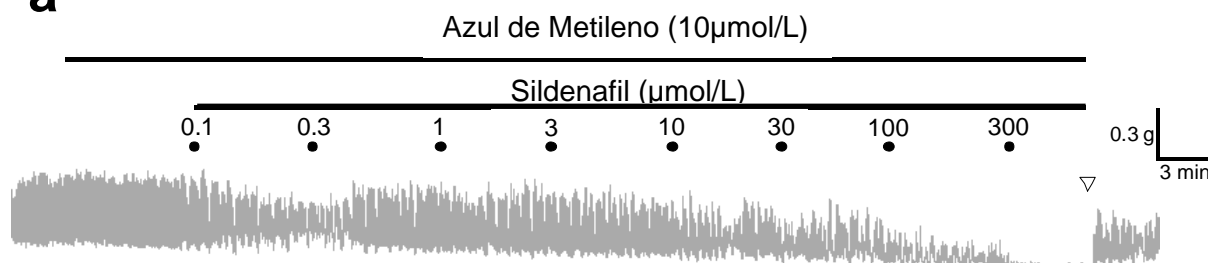
No painel a observamos traçado típico representativo do efeito da adição de concentrações crescentes e cumulativas de sildenafil (0,1 – 300 $\mu\text{mol/L}$) sobre a amplitude das contrações espontâneas de tiras de duodeno. Os intervalos (5min) e as concentrações utilizadas de sildenafil estão indicados na barra superior por círculos fechados. A lavagem da preparação, visando à recuperação da contratilidade espontânea duodenal, está indicada por meio de triângulo vazio. A recuperação está representada no tempo real dos experimentos. O painel b apresenta os valores percentuais (média \pm EPM) de relaxamento das preparações, em relação ao controle, dos tratamentos com: sildenafil-(círculos cheios), papaverina-(quadrados vazios) e zaprinaste-(círculos vazios) sobre as contrações espontâneas de tiras isoladas de duodeno de rato.

2.4.5.3 – Efeito de inibidores da guanilato ciclase sobre a ação miorelaxante do sildenafil em tiras isoladas de duodeno de ratos

Em preparações (n=11) previamente tratadas (5min) com azul de metileno (AM) (10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor inespecífico da guanilato ciclase, os valores de EC_{50} do sildenafil foram significativamente ($p < 0,05$) aumentados para 39,0 [23,9 – 63,4] $\mu\text{mol/L}$. Na presença do ODQ (10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor

específico da guanilato ciclase, os valores de EC_{50} do sildenafil também foram significativamente ($p < 0,05$) aumentados para $43,8 [24,5 - 78,3] \mu\text{mol/L}$ ($n=8$), quando comparados aos valores encontrados nas preparações tratadas somente com sildenafil (EC_{50} de $9,6 \mu\text{mol/L}$) (Figura 2.4.7).

a



b

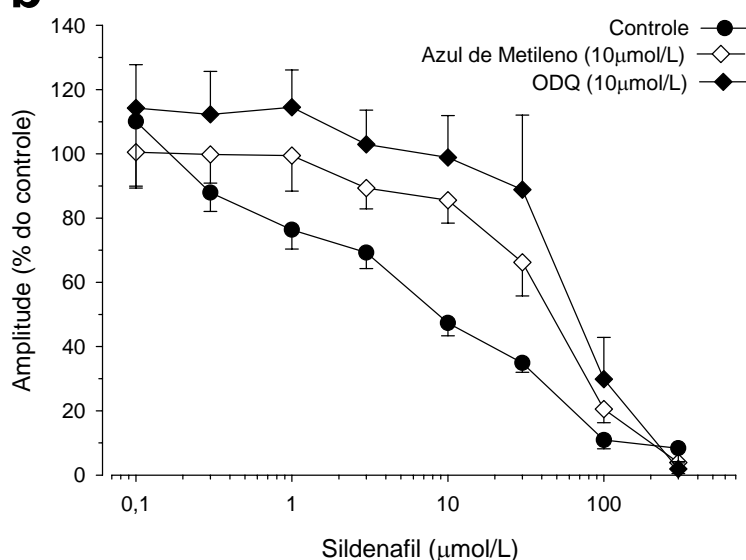


Figura 2.4.7 – Efeitos do pré-tratamento com azul de metileno (AM) e do ODQ sobre a propriedade mio-relaxante do sildenafil em preparações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*.

No painel (a) podemos observar traçado típico representativo da ação do sildenafil sobre as contrações de tiras de duodeno na presença de AM ($10 \mu\text{mol/L}$). O período de exposição da preparação ao AM está indicado na linha superior.

As adições de sildenafil em concentrações crescentes e cumulativas ($0,1 - 300 \mu\text{mol/L}$), os intervalos (5min) bem como as concentrações das drogas estão indicados na barra superior por meio de círculos fechados. A lavagem da preparação, visando à recuperação da motilidade espontânea duodenal, está indicada como triângulo vazio. A recuperação está representada no tempo real dos experimentos. No painel (b) o gráfico representa os valores ($\text{média} \pm \text{EPM}$) percentuais do relaxamento das contrações espontâneas das tiras de duodeno de rato na presença de sildenafil (círculos fechados), na presença de sildenafil e AM ($10 \mu\text{mol/L}$ - losangos vazios), bem como na presença de sildenafil e ODQ ($10 \mu\text{mol/L}$ - losangos fechados).

2.4.5.4 – Participação da via nitrérgica na ação miorelaxante do sildenafil em tiras isoladas de duodeno de rato

O efeito inibitório do sildenafil na motilidade intestinal também foi estudado na presença de agentes farmacológicos que modulam as vias da NO-sintetase, como L- ou D-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME ($n=6$) e D-

NAME (n=7), 10 μ mol/L, respectivamente isômeros ativo e inativo com ação inibitória sobre a atividade da NO-sintetase); a L-arginina (10 μ mol/L, n=8) (precursor da síntese de NO) ou ainda o nitroprussiato de sódio (NPS) (1 μ mol/L, n=6), notável doador de NO.

Examinando as curvas concentração-efeito, verifica-se que o efeito do sildenafil foi significativamente inibido quando da presença de L-NAME (EC₅₀ de 50 μ mol/L), mas não na presença de D-NAME (EC₅₀ de 10 μ mol/L). Já na presença de L-arginina (10 μ mol/L), o efeito do L-NAME pode ser revertido (EC₅₀ de 16,2 μ mol/L) (Figura 2.4.8). Já o NPS aumentou o efeito inibitório do sildenafil (EC₅₀ de 8 μ mol/L).

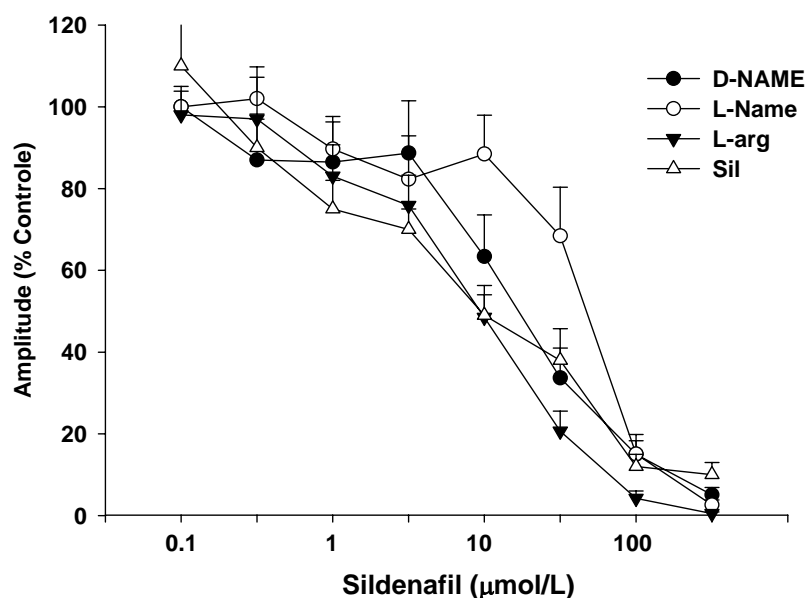


Figura 2.4.8 – Efeitos do pré-tratamento com L-NAME, D-NAME ou L-Arginina (L-Arg) sobre a propriedade miorelaxante do sildenafil em preparações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*.

O gráfico representa os valores (média \pm EPM) percentuais do relaxamento das contrações espontâneas das tiras de duodeno de rato na presença de sildenafil (0,1-30010 μ mol/L triângulos vazios), na presença de

sildenafil e L-NAME (10 μ mol/L - círculos vazios), na presença de sildenafil e D-NAME (10 μ mol/L - círculos cheios), bem como na presença de sildenafil, L-NAME e L-Arg (10 μ mol/L - triângulos vazios).

2.4.5.5 – Participação do AMP cíclico na ação miorelaxante do sildenafil em tiras isoladas de duodeno de ratos.

A adição prévia da forskolina à solução do banho (n=6) produziu aumento no efeito miorelaxante do sildenafil, com EC₅₀ correspondendo a 8,2 vs 9,6 μ mol/L das preparações controle (p<0,05) (Figura 2.4.9).

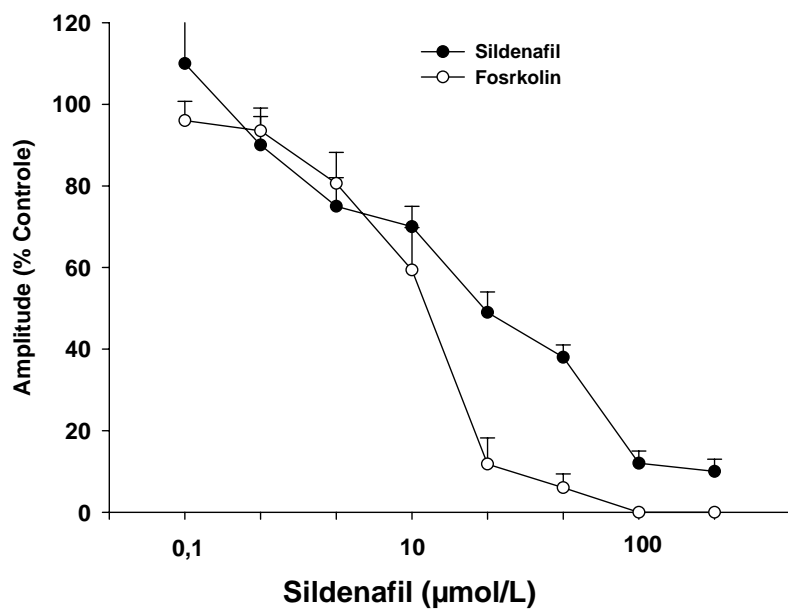


Figura 2.4.9 – Efeito do pré-tratamento com forskolina sobre a propriedade miorelaxante do sildenafil em preparações de tiras isoladas de duodeno de rato *ex vivo*.

O gráfico representa os valores (média±EPM) percentuais do relaxamento das contrações espontâneas das tiras de duodeno de rato na presença de sildenafil (círculos fechados), bem como na presença de sildenafil e forskolina (10µmol/L - círculos vazios).

**Então é chegada a hora
(Antoine Saint Exupéry)**

3 - DISCUSSÃO

Mostramos que a administração e.v. de sildenafil: i) retarda o esvaziamento gástrico (EG), o trânsito gastrintestinal (GI) e o trânsito intestinal de líquido em ratos acordados; além de ii) aumentar a complacência gástrica de ratos anestesiados. Já em ensaios *in vitro*, o sildenafil apresenta iii) efeitos antiespasmódico e miorelaxante sobre tiras isoladas de duodeno de ratos *ex vivo*.

Vale salientar que os efeitos do sildenafil e.v. sobre o EG e sobre o trânsito GI se iniciaram cerca de 20min após a administração do fármaco e assim se mantiveram por pelo menos 40min após este tratamento. Num grupo separado de animais, a pressão arterial foi monitorada de forma contínua, sendo descontinuada apenas por ocasião da gavagem. Para tanto, utilizamos um sistema para aquisição e registro de dados em microcomputador (PowerLab-ADInstruments®), considerado padrão pela literatura. Os resultados basais de pressão arterial são semelhantes aos obtidos por outros autores (Cardoso *et al.*, 2005). O sildenafil produziu fugaz efeito hipotensor, tendo a PA retornado a níveis similares aos basais logo após 10min do tratamento, tal como ocorre com outras drogas com ação nas fosfodiesterases (Dundore *et al.*, 1992).

Empregamos nos estudos de EG e de trânsito GI, metodologia baseada na retenção fracional de um corante, o vermelho-fenol (Hunt, 1951; Reynel e Spray, 1956). Esta técnica está bem estabelecida na literatura (Sharma, 1985), e é extensivamente utilizada em nosso laboratório (Rego *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2002 e Camurça *et al.*, 2004).

Este método se presta à avaliação da motilidade gastrintestinal, sendo bastante eficaz para estudos de EG e trânsito GI. Ainda que implique em gavagem da refeição, o fato de poder ser utilizado em animais acordados é vantagem adicional, ao evitar o eventual efeito da anestesia sobre as funções autonômicas, minimizando estas interferências nas condições dos animais (Bueno *et al.*, 1978). Vale salientar que os índices de motilidade gastrintestinal, isto é as taxas de retenção fracional do corante no estômago e no intestino, obtidos em ratos tratados somente com diluente

são similares aos descritos por outros autores (Ronsini *et al.*, 2000; Collares *et al.*, 2003).

Os achados de retarde no EG e no trânsito GI podem estar relacionados com a metodologia utilizada, pois o vermelho fenol, marcador usado na refeição teste, é sensível às modificações do pH (Almeida *et al.*, 2005). Ademais, eventuais efeitos do sildenafil sobre a secreção cloridopéptica podem interferir nos resultados obtidos, pois o sildenafil pode bloquear também as FDE's do tipo 5 presentes nas células secretoras do TGI (Sopory *et al.*, 2004).

Para afastar esse eventual viés, realizamos uma série de experimentos com animais cuja secreção gástrica de HCl fora reduzida pelo pré-tratamento com omeprazol – potente inibidor da bomba de prótons. Comparado aos valores encontrados nos animais controle, o omeprazol diminuiu de forma significativa *per se* as taxas de retenção gástrica. Nos animais pré-tratados com omeprazol, o sildenafil promoveu elevação nos valores de retenção gástrica, tal como àquela encontrada nos animais pré-tratados com diluente.

Nossos resultados de retarde no EG e no trânsito GI são comparáveis aos encontrados por Sarnelli e colaboradores (2004) e Patil e colaboradores (2005) indicando que o sildenafil aumenta significativamente a retenção gástrica pós-prandial e retarda o esvaziamento gástrico de refeição líquida em voluntários saudáveis e camundongos, respectivamente. Segundo a interpretação prevalente dos especialistas, o retarde no esvaziamento gástrico de líquido, tal como provocado pelo sildenafil, deve advir do menor tônus do estômago proximal (Kelly, 1980) e/ou da maior resistência antroduodenal ao fluxo de líquido (Weisbrodt, 2001).

O estômago, por intervenção das suas porções proximal e distal, pode determinar diferentes padrões de EG para variados tipos e composições de refeições (Rao e Schulze-Delrieu, 1993). O segmento proximal funcionaria como reservatório, capaz de acomodar a refeição enquanto as contrações fásicas do antro e corpo proveriam o gradiente de pressão para mistura dos conteúdos intraluminais, auxiliando na propulsão

do conteúdo gástrico para o duodeno (Rao e Schulze-Delrieu, 1993 e Weisbrodt, 2001).

No presente estudo, utilizamos um sistema pletismométrico para monitorar continuamente as variações do volume gástrico em ratos anestesiados. Além de importante efeito hipotensor, verificamos que o sildenafil é capaz de diminuir de forma dose dependente e sustentada o tônus da musculatura lisa do estômago, aumentando, portanto, a complacência gástrica.

Tal sistema, previamente desenvolvido e validado em nosso laboratório (Graça *et al.*, 2000), se mostra, segundo Souza e colaboradores (2003), adequado para monitorar continuamente as variações do tônus do estômago (em especial das porções proximais, o fundo e o terço proximal do corpo gástrico), refletindo modificações do volume gástrico e, em última instância, a complacência gástrica. Tal sistema foi, inclusive, recentemente adaptado para uso em camundongos (Monroe *et al.*, 2004).

O presente resultado de aumento na complacência gástrica pelo sildenafil confirmam os achados de Sarnelli e colaboradores (2004) que observaram aumento significativo na complacência gástrica de voluntários sadios após a ingestão de um comprimido de sildenafil (Viagra®), na dose de 50mg comumente empregue na terapêutica da disfunção erétil.

Chama a atenção o importante efeito hipotensor do sildenafil nos animais anestesiados, mesmo tendo-se o cuidado de adotar dose menor (3mg/Kg) do que a dos estudos com animais acordados (4mg/Kg), quando o sildenafil apresentou efeito hipotensor apenas transitório. Embora estudos anteriores do nosso grupo (Capelo *et al.*, 1983; Graça *et al.*, 2002) indiquem que a hipotensão arterial advinda de hemorragia ocasione aumento da complacência gástrica em ratos anestesiados, consideramos que o presente aumento da complacência gástrica pelo sildenafil seja resultante de ação mio-relaxante do fármaco sobre a célula muscular lisa do estômago (Rosalmeida *et al.*, 2002), pois outros reconhecidos agentes hipotensores, tais como acetilcolina, histamina e bradicinina não diminuem o tônus gástrico (Bojo *et al.*, 1994; Weisbrodt, 2001).

Tendo em vista que o sildenafil, ao ultrapassar a barreira hematoencefálica, pode inibir as FDEs do tipo 5, presentes no sistema nervoso central (Beavo, 1995; Vobig, 1999), é possível que o presente aumento da complacência gástrica também esteja relacionado ao aumento da atividade simpática promovida pelo próprio sildenafil (Phillips *et al.*, 2000; Ishiguchi *et al.*, 2000) e/ou ainda aos efeitos reflexos de ativação simpática decorrentes da ação direta do sildenafil ou pela diminuição expressiva dos níveis de PA.

Neste sentido, verificamos nos estudos de complacência gástrica possível participação do sistema nervoso autônomo – no seu componente simpático – modulando o aumento da complacência gástrica pelo sildenafil. Assim, a prévia esplancnotomia ou o pré-tratamento com propranolol; conseguiram ambos, reverter, por completo, o aumento da complacência gástrica induzido pelo sildenafil.

Somado a isso, a hipotensão arterial desencadeada pela injeção e.v. de sildenafil, pode promover, *per se*, aumento da atividade simpática para o TGI e, conseqüentemente promover aumento da complacência gástrica tal como descrito por Bojo e colaboradores (1994), ao verificarem que a ioimbina, reconhecido agente antagonista α -2 adrenérgico, aumenta a complacência gástrica de ratos anestesiados.

Vale ressaltar que o padrão de motilidade duodenal também pode determinar alterações na taxa de esvaziamento gástrico, uma vez que as porções iniciais do duodeno parecem atuar como barreira ou “freio” ao esvaziamento gástrico, em especial das refeições sólidas e calóricas (Weisbrodt, 2001; Haba *et al.*, 1993).

Diante dessa hipótese realizamos outra série de estudos para avaliação do efeito do sildenafil no trânsito intestinal de ratos acordados, mediante cintilografia. Com esse propósito, um grupo de animais recebeu a refeição teste, 1,0ml de solução salina isotônica marcada com ^{99m}Tc -fitato, diretamente no duodeno, por meio de cânula previamente implantada. O trânsito intestinal foi ao final estimado por meio da progressão do marcador ao longo do intestino delgado.

Essa técnica foi descrita por Miller e colaboradores (1981) e os resultados aqui descritos no grupo de ratos tratados com diluente são semelhantes àqueles descritos por outros autores (Taylor *et al.*, 1985; Troncon *et al.*, 2000). Os resultados indicam importante retarde no trânsito intestinal da refeição teste nos animais pré-tratados com sildenafil quando comparado ao grupo tratado com diluente.

A propriedade inibitória da motilidade gastrintestinal pelo sildenafil, capaz de promover retarde do EG, do trânsito GI, do trânsito intestinal e aumento da complacência gástrica, nos levaram a desenvolver novo grupo de estudo empregando tiras isoladas de segmentos do trato gastrintestinal de ratos, para esclarecer o mecanismo de ação inibitória do sildenafil sobre a musculatura lisa gastrintestinal.

Em 1917, Paul Trendelenberg desenvolveu a preparação *in vitro* do estudo farmacológico do reflexo peristáltico, modelo clássico para avaliação dos fenômenos envolvidos na contração e no relaxamento da musculatura lisa em geral (Davenport, 1989). No presente estudo a preparação foi acoplada a um sistema para aquisição e registro em microcomputador (Dataq Instruments Akron®) permitindo a monitoração contínua da contratilidade (espontânea e induzida) de tiras isoladas da musculatura longitudinal do duodeno. O delineamento experimental utilizado foi similar ao descrito por outros autores (Leal-Cardoso *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 2004).

Os estudos da contratilidade *in vitro* indicam que o sildenafil, nas concentrações entre 0,1 a 300 $\mu\text{mol/L}$, apresenta efeito inibitório sobre tiras isoladas de duodeno de ratos. Essa inibição está na mesma direção dos resultados obtidos com preparações isoladas do trato gênito-urinário (Jeremy *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 1998), os quais mostram efeito inibitório ainda mais potente do sildenafil, com IC_{50} de ordem de 4nM.

A redução da amplitude das contrações duodenais espontâneas pelo sildenafil foi mais potente do que as obtidas pelo zaprinaste ou papaverina, conhecidos inibidores das fosfodiesterases (Kukovetz *et al.*, 1970; Harris *et al.*, 1989, Gibson, 2001).

Vale salientar que os efeitos antiespasmódico e mio-relaxante do sildenafil desaparecem após a lavagem da preparação. A inibição das contrações fásicas induzidas por acetilcolina e das contrações tônicas promovidas pelo carbacol em tiras isoladas de duodeno de ratos é então seguida de recuperação quase completa da atividade contrátil espontânea, indicando a viabilidade da preparação.

Tais efeitos inibitórios do sildenafil em preparações longitudinais do duodeno explicariam, em parte, a propriedade deste fármaco em retardar o trânsito intestinal, pois o encurtamento da musculatura longitudinal intestinal auxilia na propulsão do bolo alimentar ao longo do TGI (Rao e Schulze-Delrieu, 1993; Weisbrodt, 2001).

A conduta motora do músculo liso gastrintestinal é diversa: enquanto o esfíncter esofágico inferior exhibe intensa contração tônica, a musculatura gástrica e intestinal exibem contrações fásicas com distintas ritmicidades.

No miócito liso gastrintestinal, os neurotransmissores promovem a abertura de canais dependentes de voltagem na membrana celular ocasionando influxo de Ca^{++} bem como liberação de Ca^{++} dos estoques citoplasmáticos via fosfatidilinositol tri-fosfato (Rao e Schulze-Delrieu, 1993; Weisbrodt, 2001). Assim, mesmo sob potencial de membrana estável, ativadores da proteína G podem liberar Ca^{++} . Pela idéia prevalente, o Ca^{++} citoplasmático ao se ligar a proteína calmodulina ativaria a proteína quinase de cadeia leve, a qual potencializa a capacidade da actina em ativar a miosina- Mg^{++} -ATPase para em seguida ocorrer hidrólise do ATP ligado à cabeça da miosina, provocando o deslizamento dos miofilamentos (Corbin *et al.*, 1999; Weisbrodt, 2001).

Por outro lado, os estoques citosólicos de Ca^{++} são subtraídos pela ativação da enzima Ca^{++} -ATPase (transferindo Ca^{++} para fora da célula ou de volta aos estoques intracelulares) bem como pela própria repolarização (inibindo a entrada de Ca^{++} , via canais operados por voltagem), ou ainda por ação da bomba $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$ -ATPase. A miosina é então desfosforilada,

interrompendo a interação miofilamentar e permitindo o relaxamento muscular (Corbin *et al.*, 1999; Weisbrodt, 2001).

O estado de contração e relaxamento do músculo liso é determinado, também, pelo balanço intracelular dos nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), sistemas do tipo segundo mensageiro, os quais são sintetizados, respectivamente pela adenilato e guanilato ciclases e degradados por enzimas intracelulares conhecidas como fosfodiesterases (FDEs) (Beavo, 1995; Corbin *et al.*, 1999). (Fig. 3.1)

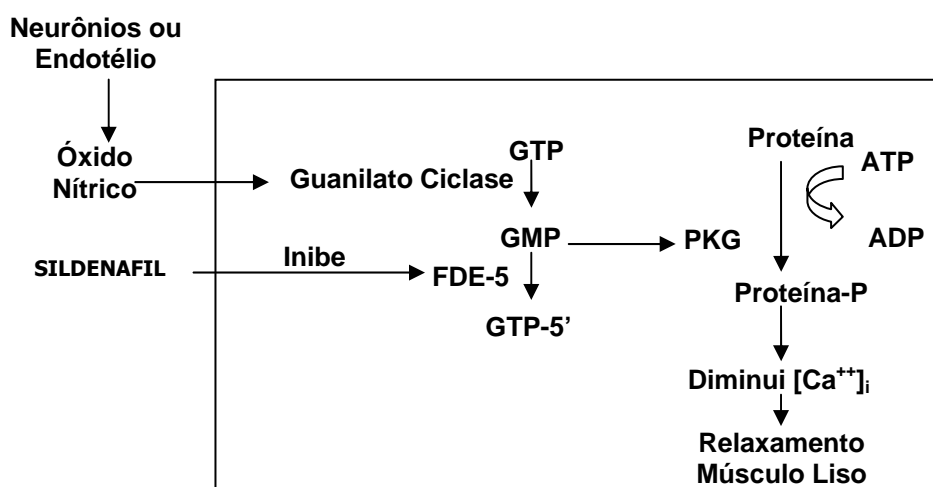


Figura 3.1 – Figura ilustrativa do mecanismo de relaxamento do músculo liso.

(GTP–guanossina trifosfato; GMP–guanossina monofosfato; FDE–fosfodiesterase; PKG–proteína quinase G;

ATP– adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; P–fósforo; [Ca⁺⁺]_i– concentração intracelular de cálcio. Adaptada de Corbin *et al.* (1999)

As fosfodiesterases constituem superfamília de enzimas (isoformas) que catalizam a reação de hidrólise dos 3',5' nucleotídeos cíclicos aos seus correspondentes nucleosídeos. Atualmente, as FDEs são classificadas em 11 famílias (Fawcett *et al.*, 2000) e inibidores seletivos das FDEs já foram identificados para alguma delas.

Segundo vários autores (Polson e Strada, 1996; Raeburn e Advenier, 1995; Qiu *et al.*, 2001; Kaneda *et al.*, 2003), o relaxamento induzido por inibidores seletivos de FDEs em diferentes músculos lisos depende dos níveis intracelulares de AMPc e/ou de GMPc. No músculo liso colônico de cães bem como do estômago de ratos foi descrito relaxamento pelos inibidores de FDEs (Barnette *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1993). Adicionalmente, Tomkinson e Raeburn, 1996 estudaram a potência de diversos inibidores de FDEs frente a

contrações colinérgicas para o músculo liso intestinal, em especial no íleo de cobaia e de rato.

O sildenafil se tornou bastante conhecido devido a sua eficácia na terapêutica da disfunção erétil, promovendo uma revolução no comportamento sexual humano (Jonas, 2001; Steidle, 2002). Está bem estabelecida que a ação miorelaxante sobre os vasos sanguíneos dos corpos cavernosos penianos se dá por inibição seletiva da fosfodiesterase do tipo-5 (Boolell *et al.*, 1996 a e b; Ballad *et al.*, 1998).

Recentemente observou-se que o sildenafil modifica também a motilidade gastrintestinal. Inicialmente descrito como agente relaxante do esfíncter esofágico inferior em pacientes com acalásia (Bortolotti *et al.* 2000), observamos, talvez em primeira mão, que o sildenafil retarda o esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal de líquido em ratos acordados (Rosalmeida *et al.*, 2000). O sildenafil não só inibe as contrações antro-duodenais como também retarda o esvaziamento gástrico e o trânsito gastrintestinal de líquido, seja em animais ou voluntários saudáveis (Bortolotti *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Rosalmeida *et al.*, 2003, Patil *et al.*, 2005).

A motilidade gastrintestinal “minuto-a-minuto” resulta da complexa interação de uma série de neuro-transmissores adrenérgicos, colinérgicos e não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), alguns com ação excitatória e outros inibitória. O óxido nítrico (NO), sintetizado pelos neurônios do plexo mio-entérico a partir da arginina, é considerado o principal neurotransmissor NANC das células musculares lisas do trato gastrintestinal (Du *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1992).

O NO inibe a atividade contrátil da musculatura lisa do TGI de animais e de humanos, agindo diretamente sobre as células musculares e/ou indiretamente modulando reflexos neurais do TGI (Gustafsson *et al.*, 1990; Kurjak *et al.*, 1999). É opinião prevalente que o NO atue como neurotransmissor na peristalse esofágica e no relaxamento do esfíncter esofágico inferior (Rhee *et al.*, 2001). O NO também induz o relaxamento receptivo do estômago - que acomoda a refeição ingerida - e modula a motilidade inter-digestiva do TGI (Desai *et al.*, 1991; Maczka *et al.*, 1993;

Sarna *et al.*, 1993; Anand *et al.*, 1994; Rodriguez-Membrilla *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1999).

O efeito relaxante do NO sobre a musculatura lisa decorre da ativação guanilato ciclase, enzima do citoplasma celular, que estimula a conversão do GTP a GMP cíclico (Kostka *et al.*, 1993). Os níveis citoplasmáticos deste nucleotídeo são reguladas pelo balanço entre a síntese e a degradação, efetuada pela FDE do tipo 5 – uma isoforma das FDEs que degradam o GMPc. Esse conjunto de enzimas está presente nas células da musculatura lisa do TGI (Beavo, 1995).

Bloqueadores das FDEs, ao inibirem a degradação do GMPc, relaxam a musculatura lisa mediante o aumento da concentração intracelular de GMPc com a elevação dos níveis da proteína quinase G e a diminuição dos níveis intracelulares de Ca^{++} (Ballard *et al.*, 1998; Boolell *et al.*, 1996 a e b).

Os efeitos inibitórios do sildenafil sobre a motilidade do TGI dependentes de GMPc, são consistentes com as propriedades miorelaxantes dos doadores de NO, tanto em humanos como em animais (Sun *et al.*, 1998; Allescher *et al.*, 1992).

Neste sentido, observamos que o sildenafil foi efetivo em inibir a motilidade espontânea de tiras isoladas de duodeno de ratos. Ademais, esta inibição foi antagonizada pelo pré-tratamento com L-NAME, mas não pelo seu isômero inativo (D-NAME) e revertida pela L-Arginina, enquanto o relaxamento induzido pelo sildenafil foi ampliado pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Em ensaios *in vivo*, a nitro-arginina (L-NNA), outro bloqueador da NO sintetase, também preveniu o aumento da complacência gástrica pelo sildenafil, efeito este ampliado pelo NPS.

A inibição, pelo sildenafil, da contratilidade espontânea de tiras isoladas de duodeno bem como o aumento da complacência gástrica de ratos anestesiados foi prevenida pelos pré-tratamentos com o ODQ e/ou azul de metileno, inibidores da guanilato ciclase (Garthwaite *et al.*, 1995). Tais resultados são consistentes com os relatos de outros autores de que o sildenafil inibe a contratilidade do útero *in vitro* de ratas mediante aumento

dos níveis intracelulares de GMPc por inibição da FDE tipo 5 (Agha *et al.*, 2001).

Em preparações isoladas de corpos cavernosos de humanos, Jeremy e colaboradores (1997) e Chuang e colaboradores (1998) evidenciaram a participação do GMPc e da FDE do tipo 5 no efeito vasodilatador do sildenafil face à prevenção deste efeito pelo ODQ. Já em preparações de vasos deferentes de humanos, o efeito mio-relaxante do sildenafil se mantém mesmo quando do pré-tratamento com ODQ (Medina *et al.*, 2000).

Coletivamente esses dados indicam que o efeito do sildenafil depende do tipo de tecido estudado ou ainda da participação de outras vias de ação. Neste estudo, a forskolina - ativador da adenilato ciclase - potencializou o efeito mio-relaxante do sildenafil, sugerindo a participação do sistema AMPc no efeito inibitório do sildenafil na contratilidade gastrintestinal.

A inibição pelo sildenafil da motilidade gastrintestinal quanto ao esvaziamento gástrico, aos trânsitos gastrintestinal e intestinal, à complacência gástrica e à contratilidade de tiras isoladas do duodeno juntamente com os relatos de outros autores, ajudam a entender as freqüentes alterações gastrintestinais descritas em pacientes submetidos ao tratamento com Viagra®. Segundo Moreland e colaboradores (1999) e Cantrell (2004), cerca de 3% destes indivíduos apresentariam sintomatologia gastrintestinal, como diarreia e dispepsia.

Este estudo também sugere potencial relevância terapêutica do sildenafil, capaz de aumentar a complacência gástrica e assim beneficiar um grupo de pacientes com gastroparesia diabética ou secundária à insuficiência renal, os quais apresentam comprometimento da capacidade acomodativa do estômago após a ingesta (Marshall, 1998; Watkins *et al.*, 2000; Bianco *et al.*, 2002; Dishy *et al.*, 2004). O aumento da complacência gástrica induzido pelo sildenafil também poderia beneficiar pacientes dispépticos que sofram de hipersensibilidade gástrica (Vandenberghe *et al.*, 2005). Em ensaios clínicos ainda não publicados, observamos também

aumento da complacência retal e diminuição da sensibilidade colônica em pacientes com doença inflamatória intestinal após a ingesta de 50mg Viagra®.

Estudos ora em andamento no nosso laboratório indicam ainda que o sildenafil também confere proteção contra lesões gástricas induzidas pelo tratamento com drogas anti-inflamatórias não-esteroidais em ratos acordados (Santos *et al.*, 2005).

Em resumo, observamos neste trabalho que o citrato de sildenafil, além de transitória hipotensão arterial, retarda i) o esvaziamento gástrico, os trânsitos gastrintestinal e intestinal de líquido em ratos acordados; enquanto ii) aumenta a complacência gástrica em ratos anestesiados e iii) apresenta efeitos antiespasmódico e mio-relaxante sobre tiras isoladas de duodeno de ratos *ex vivo*. A inibição do sildenafil sobre a motilidade do TGI envolveria a domínio sistêmico a ativação do sistema nervoso simpático e em nível celular dependeria da dinâmica reacional dos componentes da cascata NO/GMPc/FEDs, podendo em doses farmacológicas envolver ainda os níveis intracelulares de AMPc.

4-CONCLUSÕES

- A administração e.v. de sildenafil diminui o esvaziamento gástrico e retarda os trânsitos gastrintestinal e intestinal de líquido em ratos acordados;
- A administração e.v. de sildenafil aumenta a complacência gástrica de ratos anestesiados;
- Administração e.v. de sildenafil diminui de forma transitória a pressão arterial de ratos acordados e de modo duradouro a pressão arterial de animais anestesiados;
- O sildenafil apresenta efeitos mio-relaxante e antiespasmódico sobre a contratilidade espontânea e induzida de tiras isoladas de duodeno de ratos;
- O efeito inibitório do sildenafil sobre a contratilidade de tiras de isoladas de duodeno de ratos está relacionado aos componentes da cascata NO/GMPc/FDEs;
- O efeito do sildenafil sobre a complacência gástrica é mediado conjuntamente pelo sistema NO/GMPc e pela ativação central ou periférica do sistema nervoso simpático;

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agha AM, Taha RA. Sildenafil inhibits agonist-evoked rat uterine contractility: influence of guanylyl cyclase inhibition. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 428: 343–48.
2. Allescher HD, Tougas G, Vergara P, Lu S, Daniel EE: Nitric oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. *Am J Physiol*. 1992; 262: G695-02.
3. Almeida ET, Mauro AE, Santana AM, Godoy-Neto AV. Emprego de compostos organometálicos mononucleares de paládio(ii) na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos. *Quim*. 2005; 28(3): 405-08.
4. Anand N, Paterson WG. Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. *Am J Physiol*. 1994; 226: G123-31.
5. Araújo PV, Clemente CM, da Graca JR, Rola FH, de Oliveira RB, dos Santos AA, Magalhaes PJ. Inhibitory effect of sildenafil on rat duodenal contractility in vitro: putative cGMP involvement. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32(3): 191-15.
6. Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME, Naylor AM. Effects of sildenafil on the relaxations of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *J Urol*. 1998; 159: 2164-71.
7. Barnette MS, Manning CD, Price WJ, Barone FC. Initial biochemical and functional characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes in canine colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 264(2): 801-12.
8. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*. 1995; 75: 725-48.

9. Bell FR, Grivel ML. The effect of duodenal infusion on the electromyogram of gastric muscle during activation and inhibition of gastric emptying. *J Physiol.* 1975; 248(2): 377-91.
10. Bianco A, Pitocco D, Valeza V, Caputo S, Grieco A, Miele L, Greco AV and Ghirlanda G. Effects of Sildenafil on Diabetic Gastropathy. *Diab Care-Letters.* 2002; 25(10): 1888-89.
11. Bland M. Methods based on rank order. An introduction to medical statistics. Oxford: Oxford University Press. 2nd edition, p. 2005, 1995.
12. Bojo L, Cassuto J, Nellgard P, Jonsson A. Adrenergic, cholinergic and VIP-ergic influence on gastric phasic motility in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1994; 150(1): 67-73.
13. Boolell M, Allen MJ, Ballard SA, Gepi-Attee S, Muirhead GJ, Naylor AM, Osterloh IH, Gingell C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 1996 a; 8(2): 47-52.
14. Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *Br J Urol.* 1996 b; 18:47-52.
15. Bortolotti M, Mari C, Lopilato C, Porrazzo G, Miglioli M. Effects of sildenafil on esophageal motility of patients with idiopathic achalasia. *Gastroenterology.* 2000; 118(2): 253-57.
16. Bortolotti M, Mari C, Lopilato C, La Rovere L, Miglioli M. Sildenafil inhibits gastroduodenal motility. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001; 15(2): 157-61.
17. Bueno L, Ferre JP, Ruckebusch Y. Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *Am J Dig Dis.* 1978; 23(8): 690-5.

18. Camurça FD, Queiroz DA, Leal PR, Rodrigues CL, Gondim FA, Graca JR, Rola FH, Nobre e Souza MA, Santos AA. Gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats is delayed after acute myocardial infarction. *Dig Dis Sci.* 2004; 49(5): 757-62.
19. Cantrell FL. Sildenafil citrate ingestion in a pediatric patient. *Pediatr Emerg Care.* 2004; 20(5): 314-15.
20. Capelo LR, Cavalcante DM, Leitão IA, Filho GC, da-Silva EAT. Modifications of gastric compliance in dogs related to changes in extracellular fluid volume: a possible physiological role. - - *Braz J Med Biol Res.* 1983; 16: 73-76.
21. Cardoso LM, Pedrosa ML, Silva ME, Moraes MF, Colombari E, Chianca DA Jr. Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(2): 205-14.
22. Chuang AT, Strauss JD, Murphy RA, Steers WD. Sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, specifically amplifies endogenous cGMP-dependent relaxation in rabbit corpus cavernosum smooth muscle in vitro. *J Urol.* 1998; 160: 257-61.
23. Collares EF, Vinagre AM. The effect of bacterial lipopolysaccharide on the gastric emptying of rats: a pretreatment evaluation using dexamethasone and methylene blue. *Arq Gastroenterol.* 2003; 40(2): 104-09.
24. Corbin JD, Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *J Biol Chem.* 1999; 274(20): 13729-32
25. Davenport HW. *Gastrointestinal Physiology, 1895-1975: motility.* Cap. 1. In *Handbook of Physiology a critical, comprehensive presentation of physiology knowledge and concepts.* Section 6. Vol. I Motility and Circulation. Edited by Stanley G. Schultz. American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 1989.

26. Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature*. 1991; 351: 477-79.
27. Dishy V, Cohen Pour M, Feldman L, Naftali T, Baumer M, Efrati S, Golik A, Horne T, Weissgarten J. The effect of sildenafil on gastric emptying in patients with end-stage renal failure and symptoms of gastroparesis. *Clin Pharmacol Ther*. 2004; 76(3): 281-86.
28. Du C, Murray J, Bates JN, Conklin JL. Nitric oxide: mediator of NANC hyperpolarization of opossum esophageal smooth muscle. *Am J Physiol*. 1991; 261: G1012-16.
29. Dundore RL, Habeeb PG, Pratt PF, Becker LT, Clas DM, Buchholz RA. Differential hemodynamic responses to selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases in conscious rats. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 1992; 19: 937-44.
30. Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(7): 3702-07.
31. Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*. 1995; 48(2): 184-88.
32. Gibson A. Phosphodiesterase 5 inhibitors and nitrenergic transmission - from Zaprinast to Sildenafil. *Eur J Pharmacol*. 2001; 411: 1-10.
33. Goldenberger MM. Safety and efficacy of sildenafil citrate in the treatment of male erectile dysfunction. *Clin Ther*. 1998; 20: 1033-48.

34. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *N Eng J Med*. 1998; 338: 1397-04.
35. Gondim FA, Oliveira GR, Graça JRV, Gondim RBM, Alencar HMP, Dantas RP, Santos AA, Rola FH. Neural mechanisms involved in the delay of gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume expansion in awake rats. *Neurogastroenterol Motil*. 1999; 12: 93–99.
36. Graça JRV, Gondim FAA, Cavalcante DIM, Xavier-Neto J, Messias ELM, Rego MCV, Marques JAP, Santos AA, Rola FH. Gastroduodenal resistance and neural mechanisms involved in saline flow decrease elicited by acute blood volume expansion in anesthetized rats. - *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30: 1257-66.
37. Graça JRV, Leal PRL, Gondim FAA, Rola FH, Santos AA. A plethysmometric method for gastric compliance studies in anesthetized rats. *J Pharmacol Toxicol Methd*. 2000; 43: 25-30.
38. Graça JRV, Leal PRL, Gondim FAA, Rola FH, Santos AA. Gastric compliance changes induced by acute blood volume variations in anaesthetised rats. *Braz J Med Biol Res*. 2002; 35: 405-10.
39. Gustafsson LE, Wiklund CU, Wiklund NP, Persson MG, Moncada S. Modulation of autonomic neuroeffector transmission by nitric oxide in guinea pig ileum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1990; 173: 106–10.
40. Haba T, Sarna SK. Regulation of gastroduodenal emptying of solids by gastroduodenal contractions. *Am J Physiol*. 1993; 264: G261-71.
41. Harris A, Lemp B, Bentley R, Perrone M, Hamel L. Phosphodiesterase isoenzyme inhibition and the potentiation by zaprinast of endothelium-derived relaxing factor and guanylate cyclase stimulating agents in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989; 249: 394–00.

42. Hotchkiss AK, Pyter LM, Gatién ML, Wen JC, Milman HA, Nelson RJ. Aggressive behavior increases after termination of chronic sildenafil treatment in mice. *Physiol Behav.* 2005; 17- 83(5): 683-88.
43. Hunt JN. *J Physiol Lond.* 1951;110: 159.
44. Ishiguchi T, Nishioka S, Takahashi T. Inhibitory neural pathway regulating gastric emptying in rats. *J Aut Nerv Syst.* 2000; 79: 45-51.
45. Jeremy JY, Ballard SA, Naylor AM, Miller MAW, Angelini GD. Effects of Sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus carvenosum in vitro. *Br J Urol.* 1997; 79: 958-63.
46. Jin JG, Murthy KS, Grider JR, Makhlof GM. Activation of distinct cAMP- and cGMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol.* 1993; 264 (27): G470-77.
47. Jonas U. The history of erectile dysfunction management. *International Journal of Impotence Research.* 2001; 13 (Sup3), S3-7.
48. Kaneda T, Yamamoto H, Azegami Y, Shimizu K, Urakawa N, Nakajyo S. Lack of cyclic nucleotide regulation of MBCQ-induced relaxation of rat ileal smooth muscle. *J Smooth Muscle Res.* 2003; 39(3): 47-54.
49. Kause G, Bayerl A, Heim JM, Singh S, Gerzer R. Distribution of membrane bound guanylyl cyclases in human intestine. *Gut.* 1994; 35: 1250-57.
50. Kelly KA. Gastric emptying of liquids and solids: roles of proximal and distal stomach. *Am J Physiol.* 1980; 239(2): G71-76.
51. Kostka P, Jang E, Watson EG, Stewart JL, Daniel EE. Nitric oxide synthase in the autonomic nervous system of canine ileum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1993; 264: 234-39.

52. Kukovetz WR, Poch G. Inhibition of cyclic-3',5'-nucleotide-phosphodiesterase as a possible mode of action papaverine and similarly acting drugs. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1970; 267: 189-94.
53. Kulkarni A, Singh TP, Sarnaik A, Walters HL, Delius R. Sildenafil for pulmonary hypertension after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2004; 23(12): 1441-44.
54. Kurjak M, Koppitz P, Schusdziarra V, Allescher HD. Evidence for a feedback inhibition of NO synthesis in enteric synaptosomes via a nitrosothiol intermediate. *American Journal of Physiology.* 1999; 277: G875-84.
55. Leal-Cardoso JH, Lahlou S, Coelho-de-Souza AN, Criddle DN, Pinto Duarte GI, Santos MA, Magalhaes PJ. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002; 80(9): 901-06.
56. Maczka M, Thor P, Lorens K, Konturek SJ. Nitric oxide inhibits the myoelectric activity of the small intestine in dogs. *J Physiol Pharmacol.* 1993; 44: 31-42.
57. Magalhães PJ, Lahlou S, Leal-Cardoso JH. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004; 18(5): 539-46.
58. Marshall SM. Sildenafil: a revolutionary therapy? *Diabetic Méd.* 1998; 15: 897-99.
59. Medina P, Segarra G, Torondel B, Chuan P, Domenech C, Vila JM, Lluch S. Inhibition of neuroeffector transmission in human vas deferens by sildenafil. *Br J Pharmacol.* 2000; 131(5): 871-74.
60. Miller MS, Galligan JJ, Burks TF. Accurate measurement of intestinal transit in the rat. *J Pharmacol Methods.* 1981; 6(3): 211-17.

61. Monroe MJ, Hornby PJ, Partosoedarso ER. Central vagal stimulation evokes gastric volume changes in mice: a novel technique using a miniaturized barostat. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16(1): 5-11.
62. Moreland RB, Goldstein I, Kim MM, Traish A. Sildenafil citrate, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor: research and clinical implications in erectile dysfunction. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10: 97-04.
63. Murthy K. Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Biochem J.* 2001; 360: 199-08.
64. Patil CS, Singh VP, Jain NK, Kulkarni SK. Inhibitory effect of sildenafil on gastrointestinal smooth muscle: role of NO-cGMP transduction pathway. *Indian J Exp Biol.* 2005; 43(2): 167-71.
65. Phillips BG, Kato M, Pesek CA, Winnicki M, Narkiewicz K, Davison D, Somers VK. Sympathetic activation by sildenafil. *Circulation.* 2000; 102: 3068-73.
66. Polson JB, Strada SJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36: 403-27.
67. Qiu Y, Kraff P, Craig EC, Liu X, Haynes-Johnson D. Identification and functional study of phosphodiesterases in rat urinary bladder. *Urol Res.* 2001; 29(6): 388-92.
68. Raeburn D, Advenier C. Isoenzyme-selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: effects on airways smooth muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995; 27(1): 29-37.
69. Raja SG, Nayak S. Sildenafil: Emerging Cardiovascular Indications *Ann Thorac Surg* 2004; 78: 1496 –06.

70. Rao SSC and Schulze-Delrieu K. The Stomach, pylorus and duodenum – Section 5 Normal gastrointestinal motility - Cap. 25. In An illustrated guide to gastrointestinal motility. Edited by D. Kumar and D. Wingate. 2nd Ed. Churchill Livingstone, NY, USA, 1993.
71. Rego MC, Graca JRV, Gondim FA, Gondim RB, Dantas RP, Rola FH. Effect of pyloroplasty and fundectomy on the delay of gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid elicited by acute blood volume expansion in awake rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(3): 431-37.
72. Reynell PC, Spray GH. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. *J Physiol.* 1956; 131: 452-62.
73. Rhee PL, Hyun JG, Lee JH, Kim YH, Son HJ, Kim JJ, Paik SW, Rhee JC, Choi KW. The effect of sildenafil on lower esophageal sphincter and body motility in normal male adults. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 3251-57.
74. Rodriguez-Membrilla A, Martinez V, Jimenez M, Gonalons E, Vergara P. Is nitric oxide the final mediator regulating the migrating myoelectric complex cycle? *Am J Physiol.* 1995; 268: G207-14.
75. Ronsini ML, Collares EF. Effects of adrenalectomy and adrenal enucleation on liquid gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(9): 1047-51.
76. Rosalmeida MC, Rola FH. O sildenafil afeta o esvaziamento gástrico e o trânsito gastrintestinal de uma refeição líquida em ratos acordados? XIX Encontro de Iniciação à Pesquisa da UFC. Fortaleza-Ce, 2000; Resumo -0331.
77. Rosalmeida MC, Araújo PV, Saraiva LDS, Graça JRV, Ivo BB, Nóbrega MV, Clemente CM, Magalhães PJC, Rola FH, Santos AA. *In vitro* and *in*

vivo effects of sildenafil on gut motility in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2002; 14: 589.

78. Rosalmeida MC, Saraiva LDS, Graça JRV, Ivo BB, Nóbrega MV, Gondim FAA, Rola FH, Santos AA. Sildenafil, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Delays Gastric Emptying and Gastrointestinal Transit of Liquid in Awake Rats. *Dig Diseases Scs.* 2003a; 48(10): 2064–68.
79. Rosalmeida MC, Saraiva LDS, Lira GHS, Ivo BB, Nóbrega MV, Graça JRV, Rola FH, Santos AA. Sildenafil delays the intestinal transit of liquid in awake rats. Livro de resumos do XXI Congresso da ALACF e XXXVIII Congresso da SBFis. Ribeirão Preto-SP, 2003b. (PT07-019): 333.
80. Russo A, Fraser R, Adachi K, Horowitz M, Boeckxstaens G. Evidence that nitric oxide mechanisms regulate small intestinal motility in humans. *Gut.* 1999; 44: 72-76.
81. Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission. *Am J Physiol.* 1992; 262: G379-92.
82. Santos AA. Efeito de Variações agudas da volemia sobre a motilidade duodenal em cães anestesiados e o esvaziamento gástrico de líquido em ratos acordados. Tese de Doutorado apresentada Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Depto. de Fisiologia/ USP – Ribeirão Preto – SP - 1997
83. Santos CL, Souza MHL, Souza AG, Lemos HP, Santos AA, Cunha FQ, Wallace JL. Sildenafil prevents indomethacin-induced gastropathy in rats: role of leukocyte adherence and gastric blood flow. *Br J Pharmacol.* 2005 (In Press).
84. Sarna SK, Otterson MF, Ryan RP, Cowles VE. Nitric oxide regulates migrating motor complex cycling and postprandial disruption. *Am J Physiol.* 1993; 265: G759-66.

85. Sarnelli G, Sifrim D, Janssens J, Tack J. Influence of sildenafil on gastric sensorimotor function in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004; 287(5): G988-92.
86. Schwartz MP, Samsom M, Smout AJPM. Human duodenal motor activity in response to acid and different nutrients. *Dig Dis Sci.* 2001; 46: 1472-81.
87. Sharma RK. Simultaneous measurement of gastric small intestine motility and absorption of proline in rats exposed to heat. *Indian J Med Res.* 1985; 81: 330-41.
88. Silva AP, Freire CC, Gondim FA, Lacerda RP, Graca JRV, Rola FH, Santos AA. Bilateral nephrectomy delays gastric emptying of a liquid meal in awake rats. *Ren Fail.* 2002; 24(3): 275-84.
89. Sopory S, Kaur T, Visweswariah SS. The cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5): intestinal cell expression, regulation and role in fluid secretion. *Cell Signal.* 2004; 16(6): 681-92
90. Souza MHLP, Troncon LEA, Cunha FQ, et al. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(10): 1383-90.
91. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastro-intestinal and hepatic function disease. *Gastroenterol.* 1992; 103: 1928-49.
92. Steidle CP. Sexual dysfunction: male and female issues. *Int J Fertil Womens Med.* 2002; 47(1): 32-36.
93. Sun WM, Doran S, Jones KL, Ooi E, Boeckxstaens G, Hebbard GS, Lingenfelter T, Morley JE, Dent J, Horowitz M. Effects of nitroglycerin on

- liquid gastric emptying and antropyloroduodenal motility. *Am J Physiol.* 1998; 275: G1173-78.
94. Taché Y, Maeda-Hagiwara M: Central nervous system actions of corticotropin-releasing factor to inhibit gastric emptying in rats. *Am J Physiol.* 1987; 253: G241-45.
95. Taylor PM, Tyler MJ, Shearman DJ. Gastric emptying and intestinal transit in *Bufo marinus* and the actions of E prostaglandins. *Aust J Exp Biol Med Sci.* 1985; 63(2): 223-30.
96. Tomkinson A, Raeburn D. The effect of isoenzyme-selective PDE inhibitors on methacholine-induced contraction of guinea-pig and rat ileum. *Br J Pharmacol.* 1996; 118(8): 2131-9
97. Troncon LE, Santos AA, Garbacio VL, Secaf M, Verceze AV, Cunha-Melo JR. Inhibition of gastric emptying and intestinal transit in anesthetized rats by a *Tityus serrulatus* scorpion toxin. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(9): 1053-58.
98. Turko IV, Ballard SA, Francis SH, Corbin JD. Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Mol Pharmacol.* 1999; 56(1): 124-30.
99. Vandenberghe J, Vos R, Persoons P, Demyttenaere K, Janssens J, Tack J. Dyspeptic patients with visceral hypersensitivity: sensitisation of pain specific or multimodal pathways? *Gut.* 2005; 54(7): 914-19.
100. Vobig MA: Retinal side-effects of sildenafil. *Lancet.* 1999; 24;353(9162): 1442.
101. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance DJ, Wastall P, Wright PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica.* 1999; 29(3): 297-10.

102. Watkins CC, Sawa A, Jaffrey S, Blackshaw S, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. *J Clin Invest.* 2000; 106(3): 373-84.
103. Weisbrodt NW. *Gastrointestinal Motility*. Edited by Leonard R. Johnson. 6th Ed. Mosby, St. Louis, Missouri, USA, 2001.
104. Zhang X, Tack J, Janssens J, Sifrim D. Effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on oesophageal peristalsis and lower oesophageal sphincter function in cats. *Neurogastroenterol Motil.* 2001; 13: 325-31.

6 - APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Valores individuais de Retenção Gástrica e Gastrointestinal nos animais controle (cont) (HCl 0,01N) e tratados com sildenafil (sil) (4mg/Kg), sacrificados aos: Est - estômago; Prox. - proximal; Méd - medial; Dist - distal.

1.1- 10min pós-prandiais

Animais	Est Sil	Est Cont	Prox Sil	Prox Cont	Med Sil	Med Cont	Dist Sil	Dist Cont
1	53,27	40,55	30,22	35,94	14,53	18,05	1,96	5,40
2	54,60	39,24	23,91	38,06	14,93	16,23	6,53	6,34
3	59,77	48,93	21,67	31,24	13,27	19,50	5,27	0,00
4	63,03	44,30	24,38	30,06	7,59	24,18	4,98	1,12
5	50,49	48,20	21,62	22,14	17,49	29,65	10,38	0,00
6	49,80		35,53		11,79		2,80	
7	49,59		32,24		14,24		3,10	
8	45,26		25,10		17,91		11,71	

1.2 -20min pós-prandiais

Animais	Est Sil	Est Cont	Prox Sil	Prox Cont	Med Sil	Med Cont	Dist Sil	Dist Cont
1	33,41	22,50	33,74	34,49	19,20	26,97	13,64	16,02
2	31,91	24,88	38,62	31,58	21,28	33,59	8,16	9,92
3	33,54	22,90	40,51	21,84	19,66	35,90	6,20	19,35
4	35,75	24,45	45,26	20,69	16,50	39,60	2,40	15,50
5	39,53	27,34	33,68	25,72	14,96	33,11	11,61	13,81
6	37,54	32,25	26,71	21,61	20,51	21,56	15,21	23,86
7	39,69	23,28	31,18	34,45	16,49	32,03	12,62	10,22
8	48,46		13,99		17,77		19,76	
9	39,66		27,70		19,34		13,28	
10	33,08		43,87		14,18		8,85	

1.3- 30min pós-prandiais

Animais	Est Sil	Est Cont	Prox Sil	Prox Cont	Med Sil	Med Cont	Dist Sil	Dist Cont
1	19,18	25,95	32,23	25,79	27,42	38,32	21,16	9,92
2	17,39	32,90	23,74	16,35	32,05	33,43	26,80	17,30
3	18,61	34,33	51,66	17,98	28,53	32,96	1,18	14,71
4	14,74	39,80	23,10	20,87	40,77	9,68	21,30	29,63
5	38,20	14,57	23,66	17,90	32,08	58,65	6,96	8,86
6	24,51	8,82	16,11	11,86	38,80	43,87	20,56	35,43
7	28,54		38,79		10,72		21,22	
8	37,23		18,48		26,85		17,41	
9	37,81		50,55		10,32		1,30	

APÊNDICE 2 - Valores individuais de Retenção Gástrica e Gastrintestinal nos animais pré-tratados com Omeprazol distribuídos em controle e tratados com sildenafil, sacrificados aos 10min pós-prandial. Controle (cont) (HCl 0,01N) sildenafil (sil) (4mg/Kg), Est - estômago; Prox. - proximal; Méd - medial; Dist - distal

Animais	Est Sil	Est Con	Prox Sil	Prox Cont	Méd Sil	Med Cont	Dist Sil	Dist Cont
1	28,02	21,21	15,47	22,15	54,42	25,05	2,09	31,58
2	18,38	13,93	12,69	10,65	51,15	69,03	17,78	6,39
3	12,81	13,99	31,98	3,09	52,47	76,25	2,73	6,67
4	17,24	7,14	67,91	46,18	12,46	35,36	2,38	11,31
5	58,81		34,17		4,83		2,19	
6	43,87		12,94		38,57		4,61	
7	23,40		22,98		48,12		5,49	

APÊNDICE 3 - Valores individuais de Pressão Arterial (mmHg) do grupo separado de ratos acordados tratados com sildenafil.

Animais	Basal	Sildenafil	10min	20min	30min	40min
1	90,00	70,00	80,00	85,00	85,00	85,0
2	100,00	75,00	87,50	87,50	87,50	87,5
3	100,00	75,00	80,00	80,00	90,00	90,0
4	100,00	82,30	87,00	87,00	100,00	100,0
5	90,00	60,00	85,00	85,00		
6	105,00	75,00	95,00	95,00		
7	100,00	70,00	85,00	85,00		
8	90,00	70,00	80,00	90,00		

APÊNDICE 4 - Valores individuais do centro geométrico da refeição teste (^{99m}TC) ao longo do TGI, nos animais tratados com diluente (Controle - HCl) ou com sildenafil (4mg/Kg) aos 20, 30 e 40 min pós-prandiais:

Animais	20min		30min		40min	
	Controle	Sildenafil	Controle	Sildenafil	Controle	Sildenafil
1						
2	3,41	2,84	4,14	2,15	4,30	3,93
3	3,80	1,51	3,26	3,03	3,53	3,22
4	3,01	2,71	3,63	2,93	4,46	3,13
5	3,60	3,26	3,93	3,20	4,49	3,42
6	3,65	3,02	3,84	2,79	4,20	3,40
7	3,16	2,98				
8	3,67	3,21				
9	3,11	3,00				
10	3,27					
11	2,99					

APENDICE 5 - Valores individuais do volume gástrico (ml) nos animais anestesiados e tratados com sildeanfil (sil) - (3mg/Kg) ou diluente (HCl - 0,01N) para os estudos de complacência gástrica.

5.1- Sildenafil - 3mg/Kg

Animais	Basal	Sil 10	Sil 20	Sil 30
1	2,41	2,60	2,65	2,63
2	2,65	2,85	2,88	2,91
3	2,60	2,76	2,80	2,82
4	2,95	3,15	3,15	3,15
5	3,75	3,85	3,82	3,80
6	3,46	3,62	3,66	3,66
7	2,60	2,73	2,74	2,70

5.2 - HCl (0,01N - 0,2mL)

Animais	Basal	HCl 10	HCl 20	HCl 30
1	4,30	4,57	4,30	4,16
2	2,45	2,50	2,51	2,44
3	3,15	3,16	3,87	3,60
4	3,00	3,04	3,00	2,94
5	2,40	2,55	2,65	2,61

APENDICE 6 - Valores individuais do volume gástrico (ml) nos animais anestesiados e tratados com sildeanfil (sil) (3mg/Kg) para os estudos de complacência gástrica e submetidos a:

6.1- Esplancnotomia

Animais	Basal	Sil10	Sil20	Sil30
1	3,60	3,70	3,50	3,20
2	3,60	3,65	3,40	3,15
3	2,70	3,35	3,30	3,10
4	2,80	3,15	2,62	2,21
5	3,1	3,46	3,20	2,90

6.2 - Pré-tratamento com Azul de Metileno (AM) (3mg/Kg)

Animais	Basal	AM	Sil10	Sil20	Sil30
1	2,40	2,36	2,35	2,18	2,03
2	2,10	2,05	2,25	1,92	1,78
3	2,30	2,25	2,18	2,14	2,05
4	2,78	2,76	2,55	2,27	1,98
5	2,40	2,36	2,33	2,13	1,96

6.3 - Pré-tratamento com L-NNA (3mg/Kg)

Animais	Basal	L-NNA20	Sil 10	Sil 20	Sil 30
1	2,64	2,48	2,39	2,17	1,90
2	3,00	2,79	2,72	2,53	2,49
3	2,90	2,79	3,13	2,93	2,99
4	2,25	2,00	2,04	1,96	1,93
5	2,38	2,38	2,43	2,38	2,43

6.4 - Pré-tratamento com Propranolol (Prop) (2mg/Kg)

Animais	Basal	Prop	Sil10	Sil20	Sil30
1	3,80	3,50	3,40	3,10	3,10
2	2,12	1,21	1,56	1,30	1,10
3	3,20	3,07	2,90	2,40	1,90
4	3,50	3,50	3,15	3,25	2,70
5	2,00	2,00	2,45	2,45	2,25
6	2,92	2,65	2,70	2,50	2,21

6.5- Pós-tratados com Nitroprussiato de Sódio (NPS) (1mg/Kg)

Animais	Basal	Sil 10	NPS 10	NPS 20	NPS 30
1	2,42	2,52	2,72	2,52	2,50
2	2,10	2,25	2,33	2,29	2,22
3	2,20	2,35	2,62	2,52	2,46
4	2,65	2,76	2,95	2,85	2,83
5	2,75	2,97	3,54	3,34	3,24
6	2,42	2,54	2,83	2,70	2,65

APENDICE 7 - Valores individuais de pressão arterial (mmHg) nos animais do estudo da complacência gástrica tratados com Sildenafil (3mg/Kg) ou diluente (HCl).

7.1 - Sildenafil

Animais	PA Basal	PA 10	PA 20	PA 30
1	100,00	54,10	70,80	75,00
2	116,60	59,90	50,00	50,00
3	104,20	50,00	70,80	41,60
4	105,00	55,00	55,00	55,00
5	111,40	69,40	72,50	74,20
6	102,90	73,00	75,20	61,60
7	100,80	57,00	59,10	57,80

7.2 - HCl (0,01N - 0,2 mL)

Animais	Basal	HCl 10	HCl 20	HCl 30
1	119,45	101,77	114,23	112,50
2	98,09	75,00	75,30	81,62
3	85,00	82,50	93,13	89,50
4	108,40	104,80	107,25	107,20
5	100,00	88,30	98,90	102,50

APENDICE 8 - Valores individuais de pressão arterial (mmHg) nos animais do estudo da complacência gástrica tratados com Sildenafil (3mg/Kg) e submetidos a:

8.1- Esplancnotomia

Animais	Basal	Sil10	Sil20	Sil30
1	79,70	54,70	58,30	61,40
2	83,00	54,90	63,90	64,80
3	87,60	63,20	72,90	73,30
4	83,40	57,60	65,03	66,50

8.2 - Pré-tratados com Azul de Metileno (AM) (3mg/Kg)

Animais	Basal	AM	Sil10	Sil20	Sil30
1	93,95	97,50	63,00	94,00	97,00
2	94,00	109,60	74,00	114,00	119,00
3	91,00	103,00	106,50	101,90	91,40
4	98,20	97,30	97,80	98,70	105,80
5	94,30	101,90	85,30	102,20	103,30

8.3- Pré-tratados com L-NNA (3mg/Kg)

Animais	Basal	L-NA20	Sil 10	Sil 20	Sil 30
1	76,53	94,50	82,82	93,90	96,80
2	105,80	145,60	101,20	115,70	115,30
3	112,50	135,05	89,04	109,50	115,30
4	125,01	141,70	100,30	95,30	101,90
5	127,70	163,70	137,01	150,20	147,60

8.4- Pré-tratados com Propranolol (Prop) (2mg/Kg)

Animais	Basal	Prop	Sil10	Sil20	Sil30
1	102,10	123,40	99,00	94,00	92,00
2	96,87	107,40	83,85	106,66	100,37
3	105,30	89,90	90,17	102,30	108,12
4	99,11	77,40	53,77	77,58	74,80
5	117,56	131,90	118,46	134,80	132,10
6	102,10	123,40	99,00	94,00	92,00

8.5- Pós-tratados com Nitroprussiato de Sódio (NPS) (1mg/Kg)

Animais	Basal	Sil 10	NPS10	NPS20	NPS30
1	111,30	63,30	53,60	105,30	106,30
2	93,50	64,80	45,20	39,20	35,90
3	125,00	88,70	44,02	100,70	106,50
4	117,80	68,90	48,20	74,20	86,90
5	114,70	64,70	49,20	59,20	65,30
6	112,50	70,10	48,00	75,70	80,20

APÊNDICE 9 - Valores individuais do Percentual da Amplitude de Contração de Tiras Isoladas da Musculatura Longitudinal de Dusodeno de Ratos incubadas com:

1- Sildenafil

Percentagem de amplitude

controle	$\mu\text{mol/L}$ 0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00	recupe ração
100,00	83,97	91,60	70,23	54,20	36,26	21,37	0,00	0,00	51,15
100,00	76,63	103,26	54,35	73,91	34,24	39,13	0,00	14,67	60,33
100,00	258,79	80,22	75,82	73,08	54,40	48,35	14,29	0,00	77,47
100,00	115,34	83,07	89,95	76,01	33,86	33,86	25,40	0,00	42,33
100,00	113,67	108,00	108,37	89,04	58,25	28,08	16,13	0,00	64,41
100,00	106,15	102,91	92,56	77,67	57,28	27,83	12,94	8,09	77,99
100,00	114,71	55,04	52,52	81,51	57,14	45,38	14,29	0,00	106,30
100,00	75,11	69,75	72,65	52,97	35,02	35,02	4,78	36,90	78,44
100,00	46,27	97,76	70,90	44,78	59,70	35,07	10,45	15,67	56,72

2 - Sildenafil

Percentagem de frequência

controle	$\mu\text{mol/L}$ 0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00	recupe ração
100,00	91,53	101,69	91,53	86,44	37,29	11,86	0,00	0,00	91,53
100,00	104,84	103,23	101,61	95,16	82,26	20,97	0,00	24,19	100,00
100,00	101,67	90,00	90,00	73,33	71,67	63,33	6,67	0,00	73,33
100,00	98,55	101,45	88,41	85,51	34,78	23,19	8,70	8,70	47,83
100,00	100,00	98,44	98,44	96,88	98,44	92,19	48,44	0,00	100,00
100,00	96,77	98,39	98,39	96,77	87,10	66,13	40,32	43,55	83,87
100,00	95,00	100,00	101,67	101,67	88,33	96,67	46,67	0,00	108,33
100,00	100,00	100,00	101,52	98,48	89,39	72,73	83,33	86,36	96,97
100,00	118,37	122,45	110,20	118,37	89,80	110,20	48,98	44,90	100,00

3 - Zaprinaste

Percentagem de amplitude

controle	$\mu\text{mol/L}$ 0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00	recupe ração
100,00	85,55	94,19	99,87	94,32	87,48	87,87	65,29	21,68	60,77
100,00	117,53	125,77	122,68	71,13	93,81	74,23	88,66	48,45	106,19
100,00	73,89	37,48	71,27	60,52	45,93	60,83	21,04	21,51	19,97
100,00	102,55	110,19	114,65	115,29	107,64	76,43	54,78	56,05	104,46
100,00	76,87	88,06	89,55	83,21	79,10	63,81	42,16	36,19	65,30
100,00	109,52	95,24	96,03	100,79	84,13	61,11	58,73	30,16	58,73
100,00	105,30	109,83	117,70	104,69	140,24	52,65	35,55	28,44	80,94
100,00	107,29	97,74	98,74	93,72	92,46	100,50	47,24	36,93	31,66

4 - Azul de Metileno

Porcentagem de amplitude

A Metile	$\mu\text{mol/L}$									recupe ração
10uM	0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00		
100,00	121,84	126,71	111,77	122,82	104,52	102,01	34,60	0,00		126,11
100,00	102,43	126,52	131,35	124,92	128,67	70,05	24,39	0,00		112,59
100,00	104,80	111,71	108,48	107,87	86,41	93,09	46,53	36,20		84,45
100,00	140,00	132,53	136,00	62,80	74,93	40,00	0,00	0,00		33,33
100,00	100,24	96,21	130,51	101,91	101,46	99,42	16,08	0,00		109,61
100,00	133,24	83,66	168,92	113,62	123,85	73,43	26,10	0,00		108,36
100,00	79,42	86,96	83,32	75,25	54,24	17,93	0,00	0,00		26,90
100,00	111,16	106,47	109,64	100,00	92,01	64,19	26,31	0,00		89,26
100,00	152,07	131,94	43,39	91,50	96,35	123,84	29,68	0,00		130,57
100,00	40,50	96,38	84,05	69,50	53,56	44,77	16,30	5,36		64,89
100,00	59,64	43,58	44,29	63,14	72,49	34,20	19,37	0,00		64,60

5 -ODQ

Porcentagem de amplitude

ODQ	$\mu\text{mol/L}$									recupe ração
10uM	0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00		
100,00	120,27	109,46	105,41	104,05	105,41	70,27	0,00	0,00		220,27
100,00	105,17	106,03	110,34	100,00	98,28	50,86	0,00	0,00		163,79
100,00	97,25	112,84	136,70	114,68	102,75	63,30	0,00	0,00		92,66
100,00	82,58	78,28	68,50	59,14	52,88	30,47	28,84	0,00		42,58
100,00	101,95	90,24	126,34	98,54	82,44	88,78	40,98	0,00		101,46
100,00	106,96	86,21	78,18	68,94	65,46	179,38	13,79	0,00		113,79
100,00	100,00	111,89	102,84	108,14	96,77	57,49	15,76	0,00		54,13
100,00	75,35	83,31	87,93	79,59	89,99	62,64	51,35	7,57		47,37

6 - L-NAME

Porcentagem de amplitude

L-NAME	$\mu\text{mol/L}$									recupe ração
50uM	0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00		
100,00	75,52	82,49	83,05	74,39	72,13	65,16	31,45	6,03		118,83
100,00	83,78	87,65	78,93	64,89	130,02	115,50	28,09	4,12		91,28
100,00	105,67	102,55	60,06	45,61	84,99	25,50	7,93	5,67		43,63
100,00	78,69	132,79	100,00	107,38	63,11	80,33	4,10	0,00		35,25
100,00	100,53	92,55	101,06	113,83	85,64	60,64	11,70	0,00		156,38
100,00	95,69	116,03	114,83	87,56	94,74	63,40	7,18	0,00		88,04

7-D-NAME

Porcentagem de amplitude

D-NAME	$\mu\text{mol/L}$								recupe ração
50uM	0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00	
100,00	59,76	75,61	85,92	47,95	16,57	21,56	7,98	9,65	34,15
100,00	73,46	83,11	109,65	66,89	13,81	7,51	0,00	0,00	24,40
100,00	103,79	104,57	106,92	80,42	74,80	15,54	8,49	33,81	60,31
100,00	54,26	90,16	55,59	47,61	15,16	4,26	3,99	0,00	19,15
100,00	114,23	117,38	125,71	102,26	68,51	26,01	10,08	20,82	37,50
100,00	88,24	110,29	86,76	83,82	91,91	47,06	41,18	59,56	93,38
100,00	114,08	48,11	48,32	35,29	13,24	15,13	0,00	0,00	19,33

8 - Carbacol

Porcentagem de amplitude

Carb 1uM	$\mu\text{mol/L}$								recupe ração
	0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00	
100,00	89,75	91,34	78,82	48,52	48,52	41,80	5,58	-22,10	1,71
100,00	89,43	83,32	75,56	76,80	57,39	49,22	34,02	28,98	43,44
100,00	98,35	82,00	92,86	70,58	54,34	31,39	14,16	13,17	31,83
100,00	85,14	87,81	78,96	74,53	56,58	34,93	15,10	12,67	22,92
100,00	90,04	80,93	66,37	59,22	38,51	23,62	3,76	-0,90	14,41
100,00	64,67	61,25	59,33	66,33	52,58	32,25	20,75	20,25	25,67
100,00	108,27	79,98	75,59	68,13	57,61	43,82	33,30	35,04	45,15
100,00	96,97	87,24	85,13	71,18	58,55	42,24	26,18	25,00	45,79

9 - Forskolina

Porcentagem de amplitude

Forskolina	$\mu\text{mol/L}$								recupe ração
	0,1	0,30	1,00	3,00	10,00	30,00	100,00	300,00	
100,00	89,40	93,45	63,55	32,70	0,00	0,00	0,00	0,00	139,76
100,00	103,19	100,18	94,99	60,47	0,00	0,00	0,00	0,00	259,47
100,00	112,85	107,06	114,43	112,29	0,00	0,00	0,00	0,00	99,92
100,00	97,83	102,60	90,34	76,51	43,54	22,00	0,00	0,00	44,72
100,00	95,52	94,73	75,16	43,33	20,10	4,88	0,00	0,00	115,36
100,00	76,41	60,02	58,33	41,47	0,00	0,00	0,00	0,00	31,01
100,00	96,88	96,23	67,48	49,12	19,17	15,46	0,00	0,00	56,02

8 - ANEXOS