

FRANCISCO DE ASSIS MENDES GOES JR

RELAXAMENTO DO CORPO CAVERNOSO DE COELHO INDUZIDO PELA  
FRAÇÃO ALCALOIDAL F3-5 DE *Aspidosperma ulei* MARKGR.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Senso* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva

FORTALEZA

2007

FRANCISCO DE ASSIS MENDES GOES JR

RELAXAMENTO DO CORPO CAVERNOSO DE COELHO INDUZIDO PELA  
FRAÇÃO ALCALOIDAL F3-5 DE *Aspidosperma ulei* MARKGR.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em 30 / 05 / 2007

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão Nascimento  
Universidade Estadual do Ceará

Para Annya

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor LÚCIO FLÁVIO GONZAGA SILVA, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, orientador, pelos ensinamentos e a convivência sempre agradável.

Ao Professor Doutor PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo nobre compromisso com a formação de mestres e doutores no Ceará.

Ao Professor Doutor NILBERTO ROBSON FALCÃO NASCIMENTO, do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, por dividir generosamente seus conhecimentos, essenciais ao planejamento e execução dos ensaios experimentais.

Ao Professor JOÃO BATISTA GADELHA DE CERQUEIRA, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo incentivo constante ao meu crescimento profissional.

Às Professoras Doutorãs CLÁUDIA FERREIRA SANTOS e MARTA REGINA KERNTOPF MENDONÇA, do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, pela imprescindível contribuição durante a realização dos experimentos.

Aos Professores Doutores ANTÔNIO ALDO MELO FILHO e SÉRGIO BOTELHO GUIMARÃES, pelas valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho, apresentadas durante o exame de qualificação.

Aos colegas de pós-graduação FERNANDO CÉSAR MUNIZ FREITAS e FRANCISCO JOSÉ ARNAUD BATISTA, pelo espírito de equipe e companheirismo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação *Stricto Senso* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela excelente qualidade das disciplinas ministradas.

Às Secretárias do Programa de Pós-Graduação *Stricto Senso* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, MARIA LUCIENE VIEIRA DE OLIVEIRA e MAGDA MARIA GOMES FONTENELE, pelo trabalho competente, solicitude e gentileza.

À Universidade Federal do Ceará e Universidade Estadual do Ceará, por toda a infra-estrutura disponibilizada para a realização deste estudo.

“A marcha da ciência é como a planície  
do deserto: o horizonte foge sempre”

Graça Aranha

## RESUMO

Relaxamento do corpo cavernoso de coelho induzido pela fração alcaloidal F<sub>3-5</sub> de *Aspidosperma ulei* Markgr. **FRANCISCO DE ASSIS MENDES GOES JR. Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Cirurgia). Maio, 2007. Orientador: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva.**

A disfunção erétil é um problema mundial de saúde pública e, apesar dos avanços trazidos pela utilização dos inibidores da fosfodiesterase tipo-5, ainda há muito interesse em novas alternativas de tratamento, especialmente quando derivadas de produtos naturais. Alguns pesquisadores observaram os efeitos pró-eréteis de uma fração rica em alcalóides de *Aspidosperma ulei* Markgr., denominada F<sub>3-5</sub>. Neste estudo, foi avaliado o grau de relaxamento induzido por F<sub>3-5</sub> no corpo cavernoso de coelho, bem como possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos, *in vitro*. Foram realizados diversos ensaios experimentais, utilizando-se os métodos de superfusão de tecido em cascata e de banho isolado de tecido. Com tiras de corpo cavernoso pré-contraídas com fenilefrina (5 µM), foram produzidas curvas de dose-resposta de relaxamento para F<sub>3-5</sub>, papaverina e DMSO. Também foram realizados ensaios para avaliação dos efeitos de L-NAME, 7-NI, ODQ, propranolol, atropina, sildenafil e F<sub>3-5</sub> sobre os relaxamentos mediados por nitroprussiato de sódio, acetilcolina, isoproterenol, sildenafil e F<sub>3-5</sub>. Com preparações de corpo cavernoso despolarizadas, em um meio livre de cálcio e rico em potássio (60 mM), os efeitos de F<sub>3-5</sub> e DMSO sobre as contrações induzidas pelo aumento progressivo na concentração de Ca<sup>2+</sup> (1 – 300 mM) foram observados. F<sub>3-5</sub> foi capaz de induzir o relaxamento completo do corpo cavernoso de coelho, com magnitude similar à da papaverina para todas as doses testadas, exceto 3 mg, quando apresentou relaxamento significativamente maior. As superfusões de L-NAME, 7-NI e ODQ não inibiram significativamente os relaxamentos provocados por F<sub>3-5</sub>, sugerindo que este age independentemente da via nitrérgica. Propranolol e atropina também não interferiram significativamente com os relaxamentos mediados por F<sub>3-5</sub>, indicando que receptores β-adrenérgicos ou muscarínicos também não devem estar envolvidos. F<sub>3-5</sub> não amplificou significativamente os relaxamentos promovidos por nitroprussiato de sódio ou acetilcolina, ao contrário de sildenafil, sugerindo que não age por inibição da fosfodiesterase tipo-5. Finalmente, em tecido cavernoso pré-incubado com F<sub>3-5</sub>, a dose mínima de Ca<sup>2+</sup> necessária para contração muscular foi trinta vezes superior àquela utilizada em tecido sem tratamento prévio ou tratado com DMSO. Esta inibição das contrações de corpo cavernoso mediadas pelo Ca<sup>2+</sup> sugere, portanto, que F<sub>3-5</sub> pode atuar através do bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependente.

Descritores: Apocynaceae; Fitoterápico; Impotência

## ABSTRACT

Relaxation of rabbit corpus cavernosum induced by the alkaloidal fraction F<sub>3-5</sub> from *Aspidosperma ulei* Markgr. **FRANCISCO DE ASSIS MENDES GOES JR. *Stricto Senso* Post-Graduation in Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará (Master's Degree in Surgery). May, 2007. Advisor: Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva.**

Erectile dysfunction is a worldwide public health issue and, in spite of advances brought by the utilization of type-5 phosphodiesterase inhibitors, there is still much interest in new treatment alternatives, especially when derived from natural products. Some investigators observed the pro-erectile effects of an alkaloidal-rich fraction from *Aspidosperma ulei* Markgr., named F<sub>3-5</sub>. In this study, it was evaluated the degree of relaxation induced by F<sub>3-5</sub> on rabbit corpus cavernosum, as well as possible pharmacological mechanisms involved, *in vitro*. Several experimental assays were performed, utilizing the methods of cascade tissue superfusion and isolated tissue bath. With strips of corpus cavernosum pre-contracted with phenylephrine (5 µM), dose-response curves of relaxation for F<sub>3-5</sub>, papaverine and DMSO were produced. There were also assays for evaluation of the effects of L-NAME, 7-NI, ODQ, propranolol, atropine, sildenafil and F<sub>3-5</sub> on the relaxations mediated by sodium nitroprusside, acetylcholine, isoproterenol, sildenafil and F<sub>3-5</sub>. With depolarized preparations of corpus cavernosum, in a calcium-free, potassium-rich (60 mM) medium, the effects of F<sub>3-5</sub> and DMSO on the contractions induced by the progressive increase in Ca<sup>2+</sup> concentration (1 – 300 mM) were observed. F<sub>3-5</sub> was capable of inducing complete relaxation of rabbit corpus cavernosum with magnitude similar to that of papaverine for all doses tested, except 3 mg, when it presented a significantly higher relaxation. Superfusions of L-NAME, 7-NI and ODQ did not significantly inhibit the relaxations provoked by F<sub>3-5</sub>, suggesting that it acts independently of the nitergic pathway. Propranolol and atropine also did not significantly interfere with relaxations mediated by F<sub>3-5</sub>, indicating that β-adrenergic or muscarinic receptors also might not be involved. F<sub>3-5</sub> did not significantly amplify the relaxations promoted by sodium nitroprusside or acetylcholine, as opposed to sildenafil, suggesting that it does not act through inhibition of type-5 phosphodiesterase. Finally, in cavernous tissue pre-incubated with F<sub>3-5</sub>, the minimum dose of Ca<sup>2+</sup> necessary for muscular contraction was thirty times superior to that utilized on the tissue without previous treatment, or treated with DMSO. This inhibition of the contractions of corpus cavernosum mediated by Ca<sup>2+</sup> suggests, therefore, that F<sub>3-5</sub> can act through blockade of voltage-dependent calcium channels.

Key-words: Apocynaceae; Phytotherapeutic; Impotence



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Anatomia do pênis e detalhamento da arquitetura dos corpos cavernosos nos estados de flacidez e tumescência	15
2	Mecanismo molecular do relaxamento do músculo liso peniano	19
3	<i>Aspidosperma ulei</i> Markgr.	24
4	Uleína	27
5	<i>nor-uleína</i>	28
6	Tetrahydro-3,14,4,21-elipticina	28
7	Relaxamentos máximos induzidos por doses crescentes de F <sub>3-5</sub> , papaverina e DMSO	34
8	Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de L-NAME	36
9	Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de 7-NI	37
10	Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh, sildenafil e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de ODQ	38
11	Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh, isoproterenol e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de propranolol	40
12	Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de atropina	42
13	Relaxamentos máximos induzidos por SNP e ACh, isoladamente, e durante superfusão de F <sub>3-5</sub> e sildenafil	44
14	Contrações máximas induzidas pelo CaCl <sub>2</sub> , isoladamente, e após incubação com F <sub>3-5</sub> e DMSO	46
15	Contrações máximas induzidas por doses crescentes de CaCl <sub>2</sub> , isoladamente, e após incubação com F <sub>3-5</sub> e DMSO	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Ensaio com superfusão de tecido em cascata	31
2	Ensaio com banho isolado de tecido	32
3	Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por doses crescentes de F <sub>3-5</sub> , papaverina e DMSO	34
4	Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de L-NAME	36
5	Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de 7-NI	37
6	Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de ODQ	38
7	Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh, isoproterenol e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de propranolol	40
8	Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F <sub>3-5</sub> , isoladamente, e durante superfusão de atropina	42
9	Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP e ACh, isoladamente, e durante superfusão de F <sub>3-5</sub> e sildenafil	44
10	Dados numéricos correspondentes às contrações máximas induzidas pelo CaCl <sub>2</sub> , isoladamente, e após incubação com F <sub>3-5</sub> e DMSO	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI	7-nitroindazol
ACh	Acetilcolina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
Atrop.	Atropina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
DE	Disfunção Erétil
DMSO	Dimetil sulfóxido
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro-padrão da média
GC	Guanilato ciclase
GMP	Monofosfato de guanosina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Isopr.	Isoproterenol
L-NAME	L-nitro arginina metil éster
NA	Noradrenalina
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol [4,3,-a]quinoxalin-1-ona
PDE5	Fosfodiesterase tipo 5
PDEs	Fosfodiesterases
pGC	Guanilato ciclase particulada
PGE1	Prostaglandina E1
Prop.	Propranolol
sGC	Guanilato ciclase solúvel
Sild.	Sildenafil
SNP	Nitroprussiato de sódio

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVO .....	26
3 MÉTODO .....	27
4 RESULTADOS .....	33
5 DISCUSSÃO .....	47
6 CONCLUSÃO .....	55
7 REFERÊNCIAS .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

### Bases morfológicas da ereção peniana

De modo geral, a anatomia peniana é similar em todas as espécies de mamíferos (SACHS; MEISEL, 1988). O pênis é formado por três estruturas cilíndricas: dois corpos cavernosos dorsais emparelhados e separados por um septo incompleto, e um corpo esponjoso ventral que envolve a uretra e expande-se distalmente, formando a glândula. Eles são envolvidos conjuntamente pela fáscia de Buck, tecido subcutâneo e pele (ANDERSSON; WAGNER, 1995).

A túnica albugínea contém o tecido erétil peniano e é fundamental para sua flexibilidade, rigidez e resistência. Ela é composta de uma dupla camada de fibras elásticas e colágenas, cuja espessura é variável. Nos corpos cavernosos, o revestimento albugíneo é bastante espesso, porém, no corpo esponjoso é mais delgado e menos resistente à tensão, sendo inclusive ausente na glândula (BITSCH *et al.*, 1990; HSU *et al.*, 1992).

A arquitetura dos corpos cavernosos é similar à do corpo esponjoso, exceto pela glândula, que apresenta riqueza de anastomoses venosas. Trabéculas de músculo liso, fibras elásticas e colágenas, fibroblastos, e tecido conjuntivo frouxo dispõem-se num arranjo aleatório, formando lacunas revestidas por endotélio vascular, denominadas espaços sinusoidais. Eles são abastecidos por uma densa rede de arteríolas e nervos terminais e têm papel central nos processos de ereção e detumescência (LUE, 2002).

A parte proximal do pênis não é móvel e está ligada ao osso pélvico. É chamada de raiz, composta de dois ramos e um bulbo. Os ramos correspondem às extremidades proximais dos corpos cavernosos, e conectam-se aos músculos isquiocavernosos. O bulbo compreende o segmento inicial do corpo esponjoso e associa-se ao músculo bulbocavernoso (PAGANI; DI DIO, 2002).

O principal suprimento sanguíneo ao pênis advém da artéria pudenda interna, ramo da artéria ilíaca interna. Em alguns indivíduos, artérias acessórias com outras origens podem ser responsáveis pela irrigação peniana. Após atravessar o canal de Alcock, a artéria pudenda interna se torna artéria peniana, a qual divide-se em artérias dorsal, bulbouretral, e cavernosa. A artéria cavernosa fornece numerosos

ramos terminais, denominados artérias helicinais, que penetram os corpos cavernosos e abastecem os espaços sinusoidais. As artérias helicinais têm formato espiralado e apresentam-se contraídas quando o pênis está flácido, entretanto, durante a ereção, elas retificam-se e aumentam de calibre. A artéria dorsal supre a glândula, enquanto a artéria bulbouretral irriga o bulbo e o corpo esponjoso (LUE, 2002).

A drenagem venosa peniana inicia-se com vênulas distribuídas por todo o órgão, as quais se fundem num plexo imediatamente abaixo da túnica albugínea. Deste plexo, originam-se as veias emissárias, que perfuram a túnica e organizam-se em três sistemas: superficial, intermediário e profundo. O sistema superficial traz o sangue proveniente da pele e tecido subcutâneo através da veia dorsal superficial, que drena para a veia safena. O sistema intermediário drena a parte distal (pendular) do pênis através da veia dorsal profunda, que por sua vez termina no plexo venoso periprostático. O sistema profundo recebe o sangue da parte proximal (infra-púbica) do pênis e o leva pelas veias cavernosa, crural e peri-uretral para a veia pudenda interna. Além destes padrões de drenagem, as veias dos três sistemas também se comunicam entre si, de modo variável (LUE, 2002).

O pênis recebe inervação tanto autonômica quanto somática. Fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas (autonômicas) regulam os eventos neurovasculares durante a ereção e detumescência. As fibras nervosas sensitivas e motoras (somáticas) são responsáveis pelas sensações e pelo controle da atividade dos músculos isquiocavernosos e bulbocavernoso (DE GROAT; BOOTH, 1993).

Os nervos cavernosos conduzem os impulsos autonômicos, com o componente simpático originando-se dos segmentos medulares T11 a L2, e o componente parassimpático dos segmentos S2 a S4. A estimulação medular tóraco-lombar (simpática) induz detumescência, enquanto a estimulação medular sacral (parassimpática) causa ereção (PAGANI; DI DIO, 2002). Os nervos cavernosos são facilmente lesados durante cirurgias radicais da bexiga, próstata e reto, determinando disfunção erétil (WALSH; BRENDLER; CHANG, 1990).

O nervo pudendo é responsável pela inervação somática, concentrada nos segmentos S2 a S4 da medula espinhal. Inúmeros receptores distribuídos por todo o pênis, especialmente na glândula, conectam-se aos feixes do nervo dorsal do pênis, e este ao nervo pudendo, o qual adentra a medula, de onde neurônios sensitivos conduzem o impulso até o cérebro. Os estímulos motores são conduzidos pelo nervo

podendo aos músculos isquiocavernosos e bulbocavernoso, cujas contrações são responsáveis pela fase rígida da ereção e pela ejaculação, respectivamente (LUE, 2002).

No passado, acreditava-se que o nervo dorsal do pênis fosse, assim como o nervo pudendo, puramente somático. Foi demonstrado, porém, que o nervo dorsal é misto, com fibras somáticas e autonômicas, regulando tanto a função erétil quanto a ejaculação (GIULIANO *et al.*, 1993).

Os centros supra-espinhais relacionados à função sexual e ereção peniana foram identificados, em estudos com animais, na área pré-óptica medial e no núcleo paraventricular do hipotálamo e hipocampo (McKENNA, 1998).

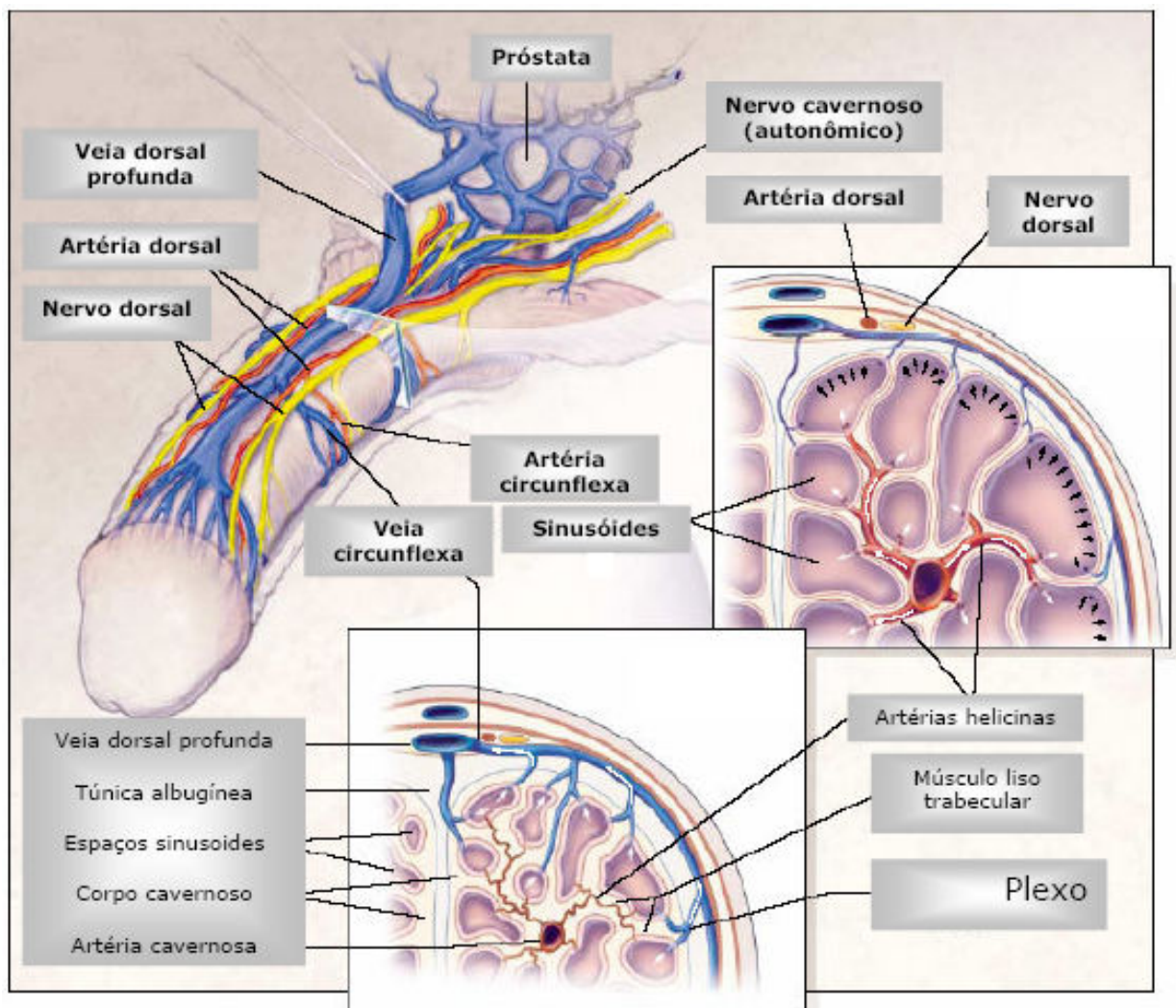


FIGURA 1 – Anatomia do pênis e detalhamento da arquitetura dos corpos cavernosos nos estados de flacidez e tumescência (Extraído de BARROS, 2005).

## Mecanismo hemodinâmico da ereção peniana

A musculatura lisa presente nos corpos cavernosos e nas paredes arteriais tem papel central na ereção peniana. No estado de flacidez, a musculatura está contraída, o que regula o suprimento sanguíneo para o mínimo necessário. Após a estimulação sexual, segue-se o relaxamento muscular, cuja primeira consequência é o aumento do fluxo sanguíneo para o pênis. Os espaços sinusoidais dos corpos cavernosos, que no estado flácido são virtuais, começam a ser preenchidos com sangue, aumentando o volume do órgão. Passa a haver compressão dos plexos venosos contra a túnica albugínea, reduzindo-se bastante a drenagem. Este mecanismo veno-oclusivo gera um aumento gradual da pressão intracavernosa, que leva o pênis da posição de relaxamento para o estado ereto (ereção cheia). Subseqüentemente, os músculos isquiocavernosos contraem-se, gerando um aumento adicional de pressão intra-cavernosa (ereção rígida). No corpo esponjoso, como a túnica albugínea é mais delgada, as pressões são cerca de metade das observadas nos corpos cavernosos, facilitando a expulsão do sêmen através da uretra. Na fase de detumescência, ocorre a reversão destes eventos. A seqüência inicia-se com um breve aumento da pressão intracavernosa, devido ao fato de que o músculo liso cavernoso começa a contrair-se quando o mecanismo veno-oclusivo ainda está funcionando. Com a reabertura dos canais venosos, a pressão diminui, a princípio lentamente e depois de modo rápido, até restabelecerem-se os parâmetros de flacidez peniana (LUE, 2002).

## Modulação farmacológica da ereção peniana

O tecido muscular liso do pênis exibe um padrão de atividade contrátil espontânea, além de ser sensível às ações de numerosas substâncias endógenas e exógenas (CHRIST *et al.*, 1990). Atualmente, está bem claro que o estado funcional do pênis (flacidez, tumescência ou ereção) é consequência direta do equilíbrio entre os estímulos à contração e ao relaxamento do músculo liso peniano. Diversos neurotransmissores e sistemas de transmissão, centrais e periféricos, estão envolvidos nestes processos (ANDERSSON, 2001).



## Neurotransmissores centrais

A regulação da função erétil no sistema nervoso central é compreendida apenas parcialmente, sendo que as maiores contribuições para isso vêm dos estudos com animais (SACHS, 2000). Dentre os neurotransmissores centrais com efeito estimulante sobre a função sexual, destacam-se a dopamina, a ocitocina, os hormônios adrenocorticotrópico e  $\alpha$ -melanócito-estimulante, os aminoácidos L-glutamato e N-metil-D-aspartato, e o NO (PEHEK *et al.*, 1988; MELIS *et al.*, 1997; ANDERSSON, 2001). Deprimem o comportamento sexual os opióides, como a morfina, bem como o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (MCINTOSH; VALLANO; BARFIELD, 1980; MELIS *et al.*, 2000). A serotonina tem um efeito geral inibitório sobre a função sexual masculina, porém dependendo dos subtipos de receptores e dos locais de ação no sistema nervoso central sua ação pode ser facilitatória (ANDERSSON, 2001). Por fim, a NA e a ACh têm papel questionável no controle central da ereção peniana, pois ainda há poucas evidências experimentais neste sentido (ANDERSSON, 2001).

## Neurotransmissores periféricos

A modulação periférica da função erétil envolve os nervos, endotélio sinusoidal e vasos sanguíneos penianos, os quais produzem e liberam substâncias que regulam o estado de contração do músculo liso cavernoso. Estes agentes se dividem entre os que promovem contração e os que estimulam o relaxamento do músculo liso cavernoso (LUE, 2002).

A inervação adrenérgica peniana é abundante, sendo a principal responsável pelo estado de flacidez do órgão. A liberação de NA, um agonista  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico causa contração da musculatura lisa do pênis (ANDERSSON; WAGNER, 1995). Nos corpos cavernosos, a densidade de receptores  $\alpha$  é cerca de dez vezes maior que  $\beta$ , tendo sido demonstrado experimentalmente que a ação direta da NA ocorre por intermédio do subtipo  $\alpha_1$  (SIRONI *et al.*, 2000). No entanto, os receptores  $\alpha_2$  também têm um possível papel na manutenção da flacidez do pênis, através de bloqueio da liberação de NO e, sendo assim, o bloqueio combinado  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  poderia ser uma forma de melhorar a função erétil (TEJADA *et al.*, 2000). É importante destacar que a estimulação de receptores adrenérgicos do subtipo  $\beta_3$  promove o

relaxamento do tecido cavernoso, por estímulo à síntese do cAMP (CIRINO, 2003). As endotelinas, liberadas pelo endotélio sinusoidal, também estão implicadas no mecanismo de flacidez peniana. Supõe-se que sua ação possa ser direta, como um regulador do tônus do músculo liso cavernoso, bem como indireta, através da modulação dos efeitos contráteis de outros agentes, principalmente a NA (LUE, 2002). Diversas evidências experimentais comprovam a ação contrátil da angiotensina II sobre o tecido muscular liso cavernoso. Entretanto, ainda não ficou claro se a angiotensina II é fisiologicamente importante na regulação do tônus deste músculo (ANDERSSON, 2003).

O pênis também é densamente provido de inervação colinérgica, encontrando-se receptores muscarínicos de quatro tipos (M1 – M4) nos corpos cavernosos (HEDLUND; ALM; ANDERSSON, 1999). A ACh é um potente indutor do relaxamento cavernoso, principalmente por estimular o endotélio cavernoso e as fibras nervosas NANC a liberarem NO (LUE, 2002). Além disso, ao ligar-se aos receptores muscarínicos dos nervos adrenérgicos, ela inibe a liberação de NA, contribuindo ainda mais para o relaxamento (KLINGE; SJOSTRAND, 1977). O polipeptídeo intestinal vasoativo é amplamente encontrado nas fibras nervosas penianas (DAIL, 1993). Ele estimula a adenilil-ciclase, causando aumento da concentração de cAMP, que está diretamente envolvido no relaxamento do músculo liso cavernoso (MILLER *et al.*, 1995). Os prostanóides, notadamente a PGE1, também estimulam a ereção pelo aumento da síntese de cAMP. O ATP causa aumento da pressão intracavernosa e ereção em experimentos com animais, porém seu papel na regulação da função erétil em humanos não é bem conhecido. Finalmente, a adrenomedulina, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e a nociceptina são outros agentes relaxantes da musculatura lisa cavernosa cuja participação no controle da ereção fisiológica é investigada (ANDERSSON, 2001).

### Óxido nítrico

A via nitrérgica parece ser a mais importante para a ereção peniana, em seres humanos (BOOLELL *et al.*, 1996). O endotélio e as fibras nervosas NANC do pênis sintetizam o NO a partir do aminoácido L-arginina. A enzima NOS é fundamental para esta síntese, pois catalisa a conversão da L-arginina em NO e L-citrulina. A NOS é encontrada em três isoformas: nNOS (neuronal), iNOS (induzível) e eNOS

(endotelial), sendo nNOS e eNOS as mais importantes para a ereção peniana (MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997).

A função do NO é ativar a GC, uma enzima de ação crucial no processo de relaxamento muscular cavernoso (IGNARRO; 1991). Esta enzima ocorre em diversos tecidos e possui duas isoformas, denominadas sGC (solúvel) e pGC (particulada). A sGC é o principal receptor peniano do NO, porém a pGC vem sendo investigada como possível alvo de modulação farmacológica da ereção (KUTHE *et al.*, 2003). Após ser ativada pelo NO, a sGC catalisa a conversão do GMP em cGMP (ANDERSSON, 2001).

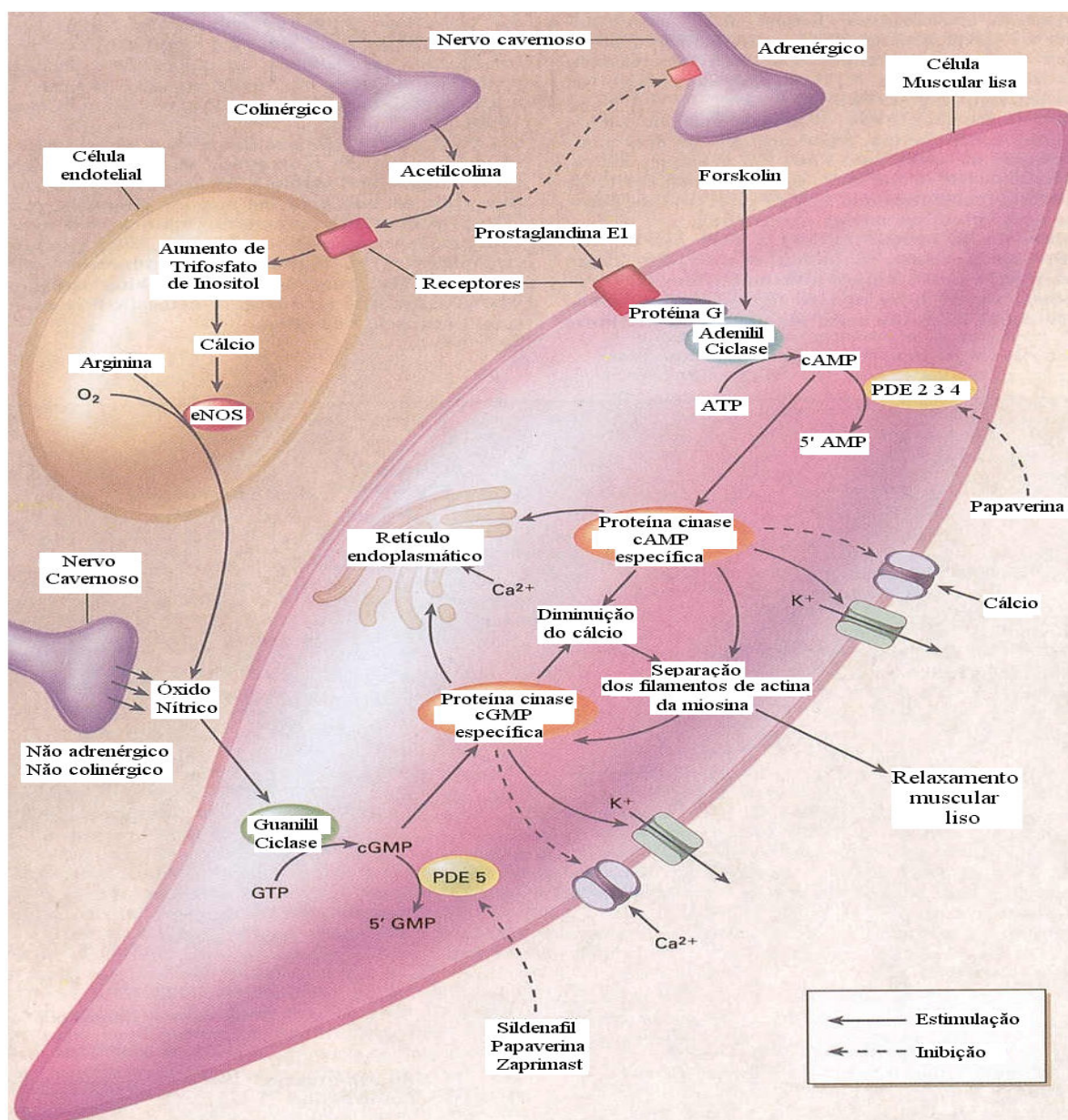


FIGURA 2 – Mecanismo molecular do relaxamento do músculo liso peniano (Extraído de SILVA, 2003).

O cGMP, assim como o cAMP, funciona como segundo mensageiro, ativando proteína cinases específicas e desencadeando um conjunto de ações que diminuem a concentração intracelular do cálcio (ANDERSSON, 2001). Estes eventos incluem abertura dos canais de potássio e hiperpolarização celular; seqüestro do cálcio intracelular no retículo endoplasmático; e inibição de canais de cálcio voltagem-dependente, com bloqueio do influxo de cálcio. A diminuição do cálcio intracelular determina dissociação dos complexos de miosina cinase e calmodulina, o que por sua vez causa desfosforilação da miosina e relaxamento muscular (LUE, 2002).

As PDEs formam uma superfamília de enzimas que hidrolisam cGMP e cAMP, convertendo-os em GMP e AMP, respectivamente. Existem numerosas isoformas de PDEs, com diferentes propriedades e distribuições teciduais (LUE, 2002). No tecido cavernoso humano, a PDE5 é responsável pela metabolização do cGMP e cAMP. Deste modo, a inibição da PDE5 causa aumento da concentração intracelular de cGMP, acentuando o relaxamento do músculo liso cavernoso mediado pelo NO (AYDIN *et al.*, 2001).

### Disfunção erétil

Os primeiros relatos de DE remontam ao ano 2000 AC, em papiros egípcios. Na Grécia, Aristóteles sugeriu que a ereção era consequência do preenchimento do pênis com ar. Posteriormente, Leonardo da Vinci observou que o pênis ereto dos homens enforcados ficava cheio de sangue, mas foi Ambroise Paré quem descreveu, em 1585, a anatomia do pênis e o mecanismo da ereção pelo aumento do fluxo sanguíneo. Apesar de tudo isso, grande parte dos conhecimentos sobre a fisiologia da ereção peniana foi obtida nos últimos 30 anos (LUE, 2002).

Atualmente, a DE é definida como incapacidade consistente ou recorrente para obtenção e / ou manutenção de ereção suficiente para atividade sexual (NIH, 1993). Por consistente, entende-se um período superior a três meses, à exceção dos casos de etiologia traumática ou iatrogênica, onde a causa da DE é óbvia. Segundo um grande estudo multicêntrico, o “Men’s Attitudes to Life Events and Sexuality” (MALES), publicado em 2004, 16% da população masculina com idade entre 20 e 75 anos já apresentou DE (ROSEN *et al.*, 2004). No Brasil, cerca de 18% dos homens na faixa etária dos 40 – 70 anos apresenta algum grau de DE, sendo que apenas uma minoria é tratada (MOREIRA *et al.*, 2001).

Há diversos sistemas para a classificação da DE. Eles podem ser baseados na causa ou no mecanismo neurovascular subjacente. A classificação proposta pela Sociedade Internacional de Pesquisa sobre Impotência divide a DE em orgânica e psicogênica. O tipo orgânico subdivide-se em etiologias vasculogênica, neurogênica, anatômica e endocrinológica. Já a DE psicogênica pode ser dos sub-tipos generalizada ou situacional (LUE, 2002).

Ao longo das últimas décadas, o tratamento da DE vem apresentando notável evolução. A utilização das próteses penianas foi o primeiro avanço importante, pois representam uma solução prática e muito eficiente. No entanto, é necessário um procedimento cirúrgico invasivo, além de haver risco de complicações infecciosas, comprometendo os resultados (TELÖKEN, 2002). A terapia de injeção intracavernosa veio posteriormente, com o objetivo de promover resultados tão efetivos quanto os das próteses, com maior simplicidade. São injetados fármacos como a papaverina, um inibidor não-seletivo das PDEs, o alprostatil, uma prostaglandina sintética, e a fentolamina, um  $\alpha$ -bloqueador adrenérgico. Entretanto, apesar dos ótimos resultados, a injeção em si pode causar incômodos ao paciente, como dor local, constrangimento do casal, e até priapismo (BRAGA; JARDIM, 2002). Até 1998, ainda não havia um tratamento para a DE que fosse ao mesmo tempo cômodo e eficaz. Neste ano, iniciou-se a comercialização do citrato de sildenafil, um inibidor seletivo da PDE5, iniciando-se a era da terapêutica oral para DE. O sildenafil mostrou excelente resultados, em diversos grupos de pacientes, além de ser bem tolerado, com efeitos adversos bem menores que os das outras opções existentes. Mais recentemente, dois outros inibidores da PDE5, tadalafil e vardenafil, juntaram-se ao sildenafil, constituindo o atual padrão-ouro de tratamento da DE (MORALES; PAGANI; GLINA, 2002).

#### Agentes naturais no tratamento da DE

A despeito do enorme sucesso dos inibidores da PDE5, as substâncias de origem natural com atividade eretogênica ainda despertam a curiosidade e interesse de pacientes e pesquisadores (DREWES; GEORGE; KHAN, 2003). A utilização em larga escala dos inibidores da PDE5 mostrou que uma parcela significativa dos usuários não está completamente satisfeita, seja por ineficácia das drogas, pelos efeitos colaterais, ou pela limitação do uso concomitante com nitratos. Além disso,

vários indivíduos admitem preferência por produtos de origem natural no tratamento da DE, estimulando a busca de novas alternativas terapêuticas (SPERLING *et al.*, 2002).

O *Ginkgo biloba* é utilizado há muitos anos pela população geriátrica tendo-se mostrado eficaz como estimulante da função erétil. As pesquisas sugerem que o *Ginkgo biloba* pode ser utilizado para tratar a DE induzida por drogas antidepressivas (MCKAY, 2004).

*Cordyceps sinensis* é um fungo, empregado tradicionalmente pela medicina chinesa. Relata-se que sua utilização promove melhoras nas funções sexuais e reprodutivas, em ambos os sexos (ZHU; HALPERN; JONES, 1998).

A maca (*Lepidium meyenii*) é uma planta nativa do Peru. Seu uso nas comunidades rurais andinas é muito tradicional, atribuindo-se a ela propriedades afrodisíacas (CICERO; BANDIERI; ARLETTI, 2001).

Uma planta chinesa famosa em todo o mundo, o ginseng (*Panax ginseng*) é consumido há séculos como afrodisíaco. Apesar disso, não existem evidências experimentais suficientes para comprovar este efeito (TODA *et al.*, 2001).

A *Eurycoma longifolia*, originária da Malásia, é empregada há anos com diversos propósitos medicinais. Seu uso como estimulante sexual é recente, o que tem suscitado a realização de pesquisas (DREWES; GEORGE; KHAN, 2003).

*Tribulus terrestris* é amplamente empregada no sudoeste da África, Índia e China para estimular a função sexual masculina. O princípio ativo protodioscina pode aumentar a libido e potencializar a ereção peniana (ADAIKAN *et al.*, 2000).

Extratos de *Huperzia saururus*, *Satureja parvifolia* e *Senecio eriophyton* também têm atividade *in vitro* comprovada. Eles relaxaram completamente corpos cavernosos pré-contraídos com fenilefrina (HNATYSZYN *et al.*, 2003).

No Brasil, uma combinação de ervas conhecida como catuama é utilizada como afrodisíaco. A catuama inclui quatro plantas: *Paullinia cupana* (guaraná), *Trichilia catigua* (catuaba), *Zingiber officinalis* (gengibre) e *Ptychopetalum olacoides* (marapuama) (DREWES; GEORGE; KHAN, 2003). Estudos *in vitro* demonstraram relaxamento pela catuama em tecido cavernoso de coelho, promovido principalmente pelo guaraná (ANTUNES *et al.*, 2001).

Muirapuama é outro produto empregado como estimulante sexual, no Brasil. Trata-se de um composto de *Ptychopetalum olacoides* e *Ptychopetalum uncinatum*, e sua eficácia já foi demonstrada em um ensaio clínico (WAYNBERG, 1990).

A planta indiana *Coleus forskohlii* é a fonte do princípio ativo forskolina, cujos estudos *in vitro* demonstraram relaxamento do tecido cavernoso, mediado pelo cAMP (DREWES; GEORGE; KHAN, 2003). Um ensaio clínico comprovou a ação eretogênica desta substância (MULHALL *et al.*, 1997).

A papaverina, obtida a partir de *Papaver somniferum*, é um inibidor inespecífico das PDEs, com potente ação no aumento das concentrações penianas de cAMP e cGMP (JEREMY *et al.*, 1997). Ela é muito eficaz para terapia de injeção intracavernosa, porém pode causar priapismo e fibrose dos corpos cavernosos (ANDERSSON, 2001).

A ioimbina, um alcalóide indólico encontrado em diversas fontes botânicas, é um potente antagonista seletivo dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , utilizada tanto em estudos farmacológicos, quanto no tratamento da DE (TAM; WORCEL; WYLLIE, 2001).

#### *Aspidosperma ulei* Markgr.

*Aspidosperma ulei* Markgr., conhecida popularmente como Pitiá, é uma árvore de grande porte, encontrada nas florestas do tipo estacional subcaducifólia das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Ela pertence ao gênero *Aspidosperma*, da família Apocynaceae, que tem cerca de 57 espécies, caracteristicamente ricas em alcalóides indólicos (BARROS, 2005).

Uma outra espécie deste gênero, *Aspidosperma quebracho blanco*, é há muito tempo associada ao tratamento da DE, na América do Sul e na Europa (BAUMBUSCH; PAPP; KOPA, 1995). Na Alemanha, onde é utilizada como droga de prescrição, foi recentemente descoberto que sua ação pró-erétil é possivelmente devida, em parte, ao seu conteúdo de ioimbina (SPERLING *et al.*, 2002).

Especula-se, portanto, que outras representantes do gênero *Aspidosperma* também possam ser empregadas na terapêutica da DE. No entanto, apesar do potencial como possível fonte de substâncias eretogênicas, são poucas as pesquisas sobre *Aspidosperma ulei* Markgr.

Banerjee e Lewis (1955) realizaram o primeiro estudo farmacológico publicado sobre *Aspidosperma ulei* Markgr. Utilizando uma solução de alcalóides extraídos do caule da planta, observaram atividade anti-espasmogênica sobre diversos tecidos de roedores.

Schmutz, Hunziker e Hirt (1957), e Lehner e Schmutz (1961), utilizando cascas da raiz de *Aspidosperma ulei* Markgr., isolaram os alcalóides uleína, 1,2-dihidro-olivacina e 1,2-dihidro-elipticina.

Abreu e Silva *et al.* (2002) demonstraram que a uleína tem atividade tripanomiscida, enquanto Soares *et al.* (2004) observaram que este alcalóide interfere com contratilidade induzida pelo cálcio em útero e aorta, aparentemente por ação direta sobre canais de cálcio.



FIGURA 3 – *Aspidosperma ulei* Markgr. (Extraído de BARROS, 2005).



Campos *et al.* (2006) isolaram uma fração alcaloidal indólica de *Aspidosperma ulei* Markgr., denominada F<sub>3-5</sub> e composta de uleína, *nor*-uleína e tetrahydro-3,14,4,21-elipticina. Eles estudaram os efeitos desta fração sobre o comportamento de camundongos machos Swiss. Foram observados padrões de atividade associados a ereção peniana nos animais tratados com o extrato, sugerindo que F<sub>3-5</sub> poderia facilitar as ereções por mecanismos dopaminérgicos, adrenérgicos e nitrérgicos.

Considerando-se o potencial de *Aspidosperma ulei* Markgr. como fonte de substâncias naturais com atividade eretogênica, bem como a escassez de pesquisas sobre este tema, decidiu-se estudar os efeitos de sua fração alcaloidal F<sub>3-5</sub> sobre o relaxamento da musculatura lisa cavernosa de coelho.

## 2 OBJETIVO

Avaliar o grau de relaxamento induzido pela fração alcaloidal F<sub>3-5</sub> de *Aspidosperma ulei* Markgr sobre o corpo cavernoso de coelho, *in vitro*, bem como possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos.

### 3 MÉTODO

#### Animais

Os estudos foram realizados de acordo com as recomendações da Comissão de Ética em Pesquisa Animal, da Universidade Federal do Ceará. O projeto de pesquisa recebeu aprovação pelo processo número 44/05.

Foram utilizados 36 coelhos da linhagem Nova Zelândia, machos, adultos, com peso entre 2,0 – 2,5 kg, obtidos na Universidade Federal do Ceará. Os animais ficaram acomodados no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, sob ciclo de claro – escuro de doze horas, sendo alimentados com dieta padrão de laboratório (Purina Chow<sup>®</sup>) e água à vontade.

#### Planta

A planta foi coletada em Garapa, município de Acarape, estado do Ceará. A espécie foi identificada e catalogada (exsicata n. 30823) no Herbário Prisco Correia da Universidade Federal do Ceará. O isolamento da fração F<sub>3-5</sub> foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, segundo o método descrito por Campos (2006). A fração contém os seguintes alcalóides indólicos: uleína, *nor*-uleína e tetrahydro-3,14,4,21-elipticina.

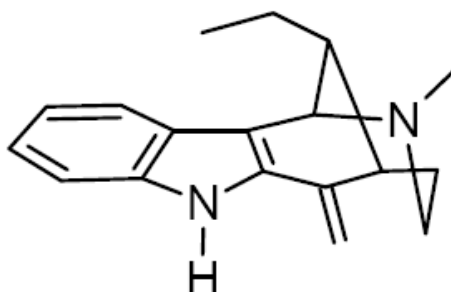


FIGURA 4 – Uleína.

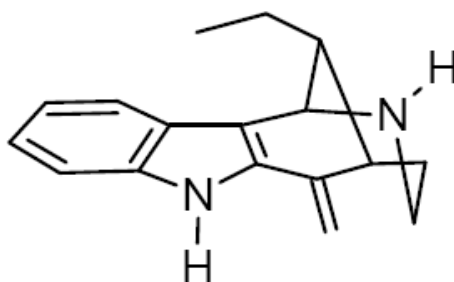
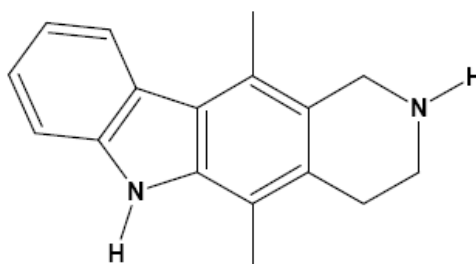
FIGURA 5 – *nor-uleína*.

FIGURA 6 – Tetrahidro-3,14,4,21-eliptícina.

## Fármacos

A solução de Krebs-Henseleit – com pH ajustado para 7,4 – foi utilizada na seguinte composição (em mM): NaCl 118; NaHCO<sub>3</sub> 25; KCl 4,7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,17; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5; e glicose 5,6. Fenilefrina, SNP, ACh, L-NAME, 7-NI, ODQ, isoproterenol, atropina e DMSO foram adquiridos de Sigma Co. (E.U.A.). O tiopental sódico foi obtido de Laboratórios Cristália (Brasil) e o citrato de sildenafil de Laboratórios Pfizer (Brasil). Todos os fármacos foram diluídos em solução salina fisiológica, exceto F<sub>3-5</sub>, que foi dissolvido em DMSO.

## Equipamentos

Utilizaram-se agitador magnético (Fanem, Brasil), agulhas descartáveis (BD, Brasil), balança analítica (Marte AL-200, Brasil), balança para pesagem de animais (Filizola, Brasil), bomba para infusão (Imbracrios BI-900, Brasil), bomba para perfusão (Watson-Marlow Limited MHRE-200, Inglaterra), material cirúrgico (EDLO, Brasil), pHmêtro (Alalion PM-608, Brasil), pipetas automáticas (Jencons, Inglaterra), pipetas Pasteur (Unilab, Brasil), ponteiras plásticas para pipetas (Unilab, Brasil),

polígrafo (Graphtec Watanabe LR-300, Japão), seringas descartáveis (BD, Brasil) e vidrarias (Vidrolabor, Brasil).

#### Preparação do corpo cavernoso de coelho

Procedeu-se à eutanásia por injeção endovenosa de tiopental sódico, em dose letal (60 mg/kg). O pênis foi removido inteiro, até o ponto de aderência com o osso pélvico, sendo imediatamente colocado em imersão na solução nutritiva de Krebs-Henseleit. Em seguida, o tecido cavernoso foi cuidadosamente dissecado, removendo-se os tecidos conjuntivos e a túnica albugínea. Cada pênis forneceu uma tira longitudinal (2 cm) de corpo cavernoso dissecado. Os segmentos de tecido cavernoso foram mantidos em solução de Krebs-Henseleit até o início dos ensaios experimentais, o que não excedeu uma hora após a remoção dos mesmos.

#### Superfusão de tecido em cascata

As tiras de corpo cavernoso foram montadas em cascata, com tensão de repouso ajustada para 2g, sendo superfundidas com solução de Krebs-Henseleit (5 ml/min) aerada com uma mistura de O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%), sob temperatura de 37°C. As respostas teciduais foram captadas através de alavancas auxotônicas ligadas a transdutores isotônicos para músculo liso, e conectados a um polígrafo de seis canais, o qual produziu os traçados correspondentes.

Decorrido o período de equilíbrio de 1 hora, foi realizado o ajuste de sensibilidade dos transdutores para obtenção de respostas de magnitude similar, e iniciou-se a superfusão de fenilefrina (5 µM), com o intuito de aumentar o tônus basal dos tecidos. Neste momento, o sistema estava pronto para utilização.

Foram realizados sete ensaios distintos (Tab. 1). Em cada um deles, as médias dos relaxamentos máximos induzidos por cada substância foram expressas como valores numéricos percentuais, em relação à média dos relaxamentos máximos determinados por SNP (1,3 – 13 nM), a qual foi definida como 100%.

No experimento I (n = 6), foram construídas curvas de dose-resposta para F<sub>3-5</sub>, papaverina e DMSO. As soluções foram infundidas em *bolus*, com doses progressivamente elevadas (0,01; 0,1; 1; 3 mg) e administradas a cada dez minutos, observando-se também um período de repouso de trinta minutos entre os testes com

substâncias diferentes.

No experimento II (n = 3), foram registrados os relaxamentos provocados pelas infusões em *bolus*, com intervalos de dez minutos, de SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), seguidas de um período de repouso de trinta minutos. Iniciou-se a superfusão de L-NAME (10 µmol/min), e após vinte minutos, infundiu-se novamente SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), respeitando-se os intervalos de dez minutos entre cada administração.

No experimento III (n = 4), foram registrados os relaxamentos provocados pelas infusões em *bolus*, com intervalos de dez minutos, de SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), seguidas de um período de repouso de trinta minutos. Iniciou-se a superfusão de 7-NI (10 µmol/min), e após vinte minutos, infundiu-se novamente SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), respeitando-se os intervalos de dez minutos entre cada administração.

No experimento IV (n = 4), foram registrados os relaxamentos provocados pelas infusões em *bolus*, com intervalos de dez minutos, de SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), seguidas de um período de repouso de trinta minutos. Iniciou-se a superfusão de ODQ (10 µmol/min), e após vinte minutos, infundiu-se novamente SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), respeitando-se os intervalos de dez minutos entre cada administração.

No experimento V (n = 4), foram registrados os relaxamentos provocados pelas infusões em *bolus*, com intervalos de dez minutos, de SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM), isoproterenol (30 nM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), seguidas de um período de repouso de trinta minutos. Iniciou-se a superfusão de propranolol (10 µmol/min), e após vinte minutos, infundiu-se novamente SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM), isoproterenol (30 nM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), respeitando-se os intervalos de dez minutos entre cada administração.

No experimento VI (n = 4), foram registrados os relaxamentos provocados pelas infusões em *bolus*, com intervalos de dez minutos, de SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), seguidas de um período de repouso de trinta minutos. Iniciou-se a superfusão de atropina (10 µmol/min), e após vinte minutos, infundiu-se novamente SNP (1,3 – 13 nM), ACh (600 pM) e F<sub>3-5</sub> (1 mg), respeitando-se os intervalos de dez minutos entre cada administração.

No experimento VII (n = 4), foram registrados os relaxamentos provocados pelas infusões em *bolus*, com intervalo de dez minutos, de SNP (1,3 – 13 nM) e ACh

(600 pM), seguidas de um período de repouso de trinta minutos. Iniciou-se a superfusão de sildenafil (10  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), e após vinte minutos, infundiu-se novamente SNP (1,3 – 13 nM) e ACh (600 pM), respeitando-se o intervalo de dez minutos entre cada administração. Neste momento, a superfusão de sildenafil foi suspensa, observando-se novo repouso de trinta minutos. Iniciou-se a superfusão de F<sub>3-5</sub> (0,1 mg/min), e após vinte minutos, infundiu-se novamente SNP (1,3 – 13 nM) e ACh (600 pM), respeitando-se o intervalo de dez minutos entre cada administração.

<b>EXPERIMENTO</b>	<b>n</b>	<b>INFUSÃO</b>	<b>SUPERFUSÃO</b>
<b>I</b>	6	SNP Papaverina F <sub>3-5</sub> DMSO	
<b>II</b>	3	SNP ACh F <sub>3-5</sub>	L-NAME
<b>III</b>	4	SNP ACh F <sub>3-5</sub>	7-NI
<b>IV</b>	4	SNP ACh F <sub>3-5</sub>	ODQ
<b>V</b>	4	SNP ACh Isoproterenol F <sub>3-5</sub>	Propranolol
<b>VI</b>	4	SNP ACh F <sub>3-5</sub>	Atropina
<b>VII</b>	6	SNP ACh	Sildenafil F <sub>3-5</sub>

TABELA 1 – Ensaio com superfusão de tecido em cascata.

#### Banho isolado de tecido

Os segmentos de corpo cavernoso foram montados em banhos isolados, com tensão de repouso de 1g, contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aerada com uma mistura de O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%), sob temperatura de 37°C. As respostas teciduais foram captadas através de alavancas auxotônicas ligadas a transdutores isotônicos para músculo liso, e conectados a um polígrafo de seis canais, o qual produziu os traçados correspondentes.

Decorrido o período de equilíbrio de 1 hora, foi realizado o ajuste de sensibilidade dos transdutores para obtenção de respostas de magnitude similar. A solução de Krebs-Henseleit dos banhos foi drenada e substituída por uma solução de Krebs-Henseleit modificada, livre de  $\text{Ca}^{2+}$  e rica em  $\text{K}^+$  (60 mM). Neste momento, o sistema estava pronto para utilização.

Neste ensaio (Tab. 2), as médias das contrações máximas provocadas pelo  $\text{CaCl}_2$  (300 mM) nos tecidos pré-incubados com outras substâncias foram expressas como valores numéricos percentuais, em relação à média das contrações máximas induzidas pelo  $\text{CaCl}_2$  (300 mM) nos tecidos sem incubação prévia, a qual foi definida como 100%.

No experimento VIII ( $n = 5$ ), foram construídas curvas de dose-resposta relativas à adição de  $\text{CaCl}_2$  aos banhos. Doses progressivamente elevadas (1; 3; 10; 30; 100; 300 mM) de  $\text{CaCl}_2$  foram acrescentadas aos banhos, em *bolus*, a intervalos de dez minutos. Em seguida, a solução de Krebs-Henseleit modificada foi substituída e, após um período de repouso de trinta minutos, os tecidos foram incubados com  $\text{F}_{3-5}$  (0,5 mg) durante vinte minutos. O  $\text{CaCl}_2$  foi adicionado novamente, em doses progressivamente elevadas (1; 3; 10; 30; 100; 300 mM), em *bolus*, a intervalos de dez minutos. A solução de Krebs-Henseleit modificada foi novamente trocada e, após trinta minutos, os tecidos foram incubados com DMSO por vinte minutos, seguindo-se a adição de doses progressivamente elevadas (1; 3; 10; 30; 100; 300 mM) de  $\text{CaCl}_2$ , em *bolus*, a intervalos de dez minutos.

EXPERIMENTO	n	INFUSÃO	INCUBAÇÃO
VIII	5	$\text{CaCl}_2$	$\text{F}_{3-5}$ DMSO

TABELA 2 – Ensaio com banho isolado de tecido.

#### Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos estão apresentados como Médias e EPM. As diferenças estatísticas foram determinadas com o uso do teste ANOVA, considerando-se significativa  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

Experimento I: relaxamento cavernoso induzido por F<sub>3-5</sub>

A Figura 7 mostra curvas de dose-resposta para F<sub>3-5</sub>, papaverina e DMSO, onde cada ponto equivale à Média ± EPM dos valores de relaxamento observados. Na Tabela 3, estão listados os valores numéricos correspondentes. Doses crescentes de F<sub>3-5</sub> e papaverina determinaram relaxamentos progressivamente maiores. F<sub>3-5</sub> e papaverina, na dose de 0,1 mg, apresentaram a primeira resposta de relaxamento significativa, em relação ao DMSO. Na dose de 3 mg, o relaxamento promovido por F<sub>3-5</sub> foi significativamente maior que o relaxamento estimulado pela papaverina.

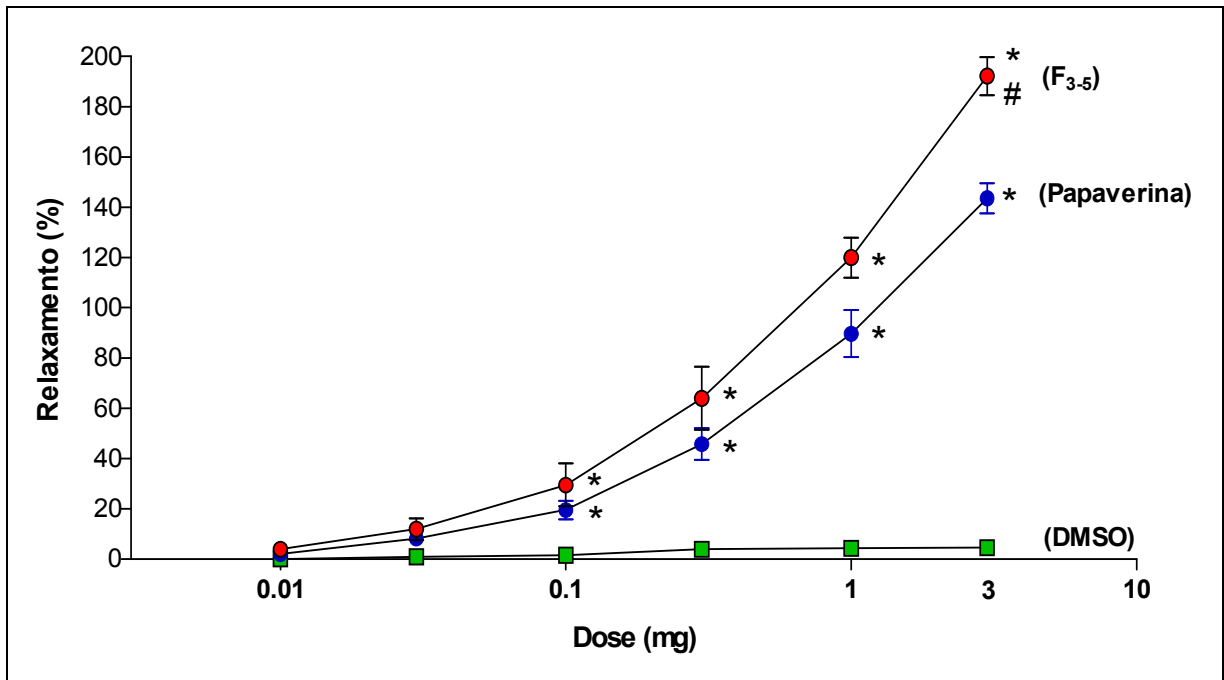


FIGURA 7 – Relaxamentos máximos induzidos por doses crescentes de F<sub>3-5</sub>, papaverina e DMSO (n = 6; \* p < 0,05, comparado com DMSO; # p < 0,05, comparado com papaverina).

Dose (mg)	F <sub>3-5</sub>		Papaverina		DMSO	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
<b>0,01</b>	3,90	2,30	2,10	0,36	0,00	0,00
<b>0,03</b>	11,90	4,30	8,20	2,90	0,90	0,10
<b>0,10</b>	29,60	8,60	19,60	3,70	1,60	0,30
<b>0,30</b>	64,00	12,60	45,80	6,30	3,90	1,20
<b>1,00</b>	119,90	8,00	89,70	9,30	4,30	1,30
<b>3,00</b>	192,10	7,60	143,50	6,00	4,60	1,60

TABELA 3 – Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por doses crescentes de F<sub>3-5</sub>, papaverina e DMSO (n = 6).

## Experimentos II, III e IV: envolvimento da via nitrérgica

Na Figura 8, as barras representam as Médias  $\pm$  EPM. Na Tabela 4, estão listados os valores numéricos correspondentes. A superfusão de L-NAME inibiu significativamente o relaxamento promovido por ACh, porém não afetou as respostas induzidas por SNP e F<sub>3-5</sub>.

Na Figura 9, as barras representam as Médias  $\pm$  EPM. Na Tabela 5, estão listados os valores numéricos correspondentes. A superfusão de 7-NI não afetou as respostas induzidas por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>.

Na Figura 10, as barras representam as Médias  $\pm$  EPM. Na Tabela 6, estão listados os valores numéricos correspondentes. A superfusão de ODQ inibiu significativamente as respostas evocadas por SNP e ACh, porém não afetou as respostas induzidas por F<sub>3-5</sub>.

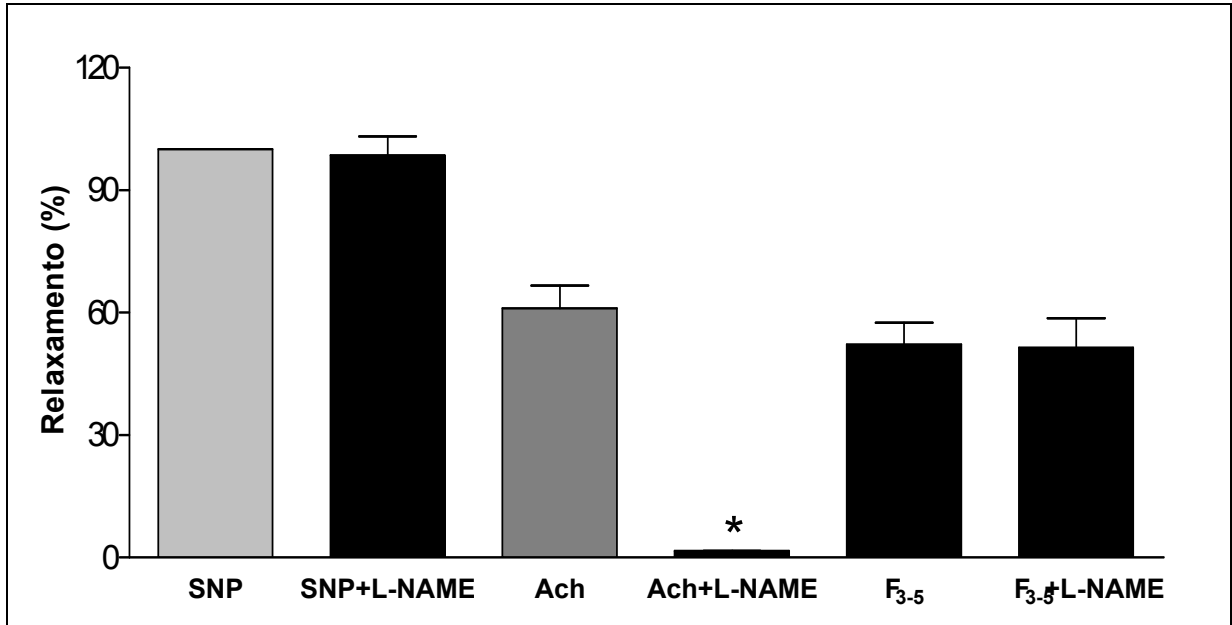


FIGURA 8 – Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de L-NAME (n = 3; \* p < 0,05, comparado com o respectivo controle).

	SNP		ACh		F <sub>3-5</sub>	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-	100,00	0,00	61,00	5,70	52,20	5,30
<b>L-NAME</b>	98,60	4,70	1,60	0,03	51,40	7,20

TABELA 4 – Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de L-NAME (n = 3).

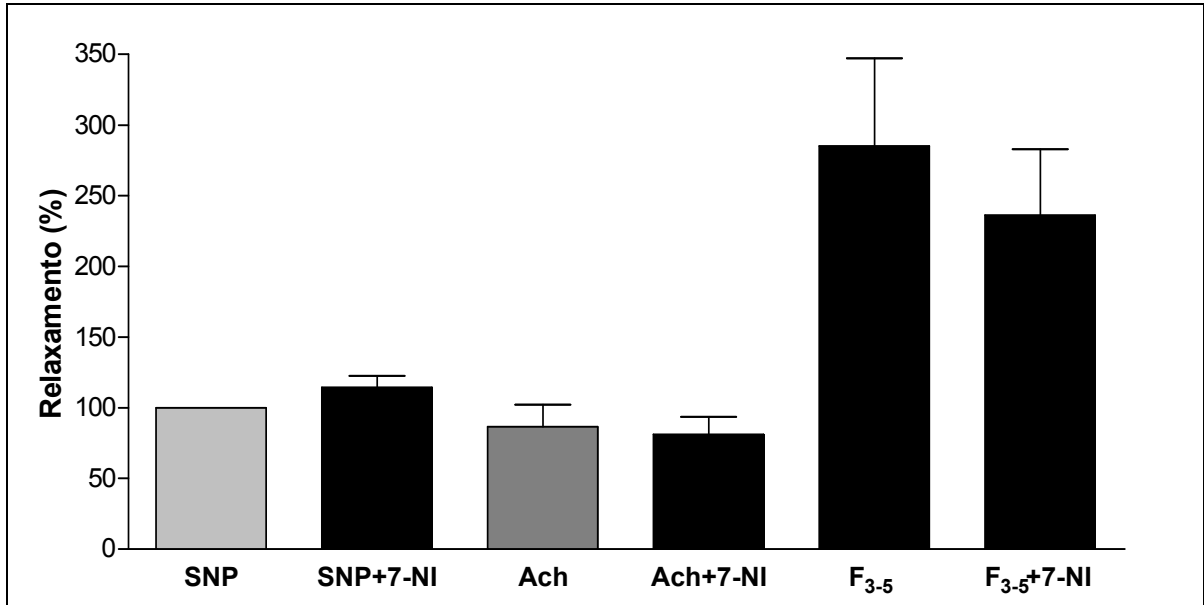


FIGURA 9 – Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de 7-NI (n = 4).

	SNP		ACh		F <sub>3-5</sub>	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-	100,00	0,00	86,60	15,70	285,10	62,10
7-NI	114,40	8,20	81,20	12,50	236,10	46,90

TABELA 5 – Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de 7-NI (n = 4).

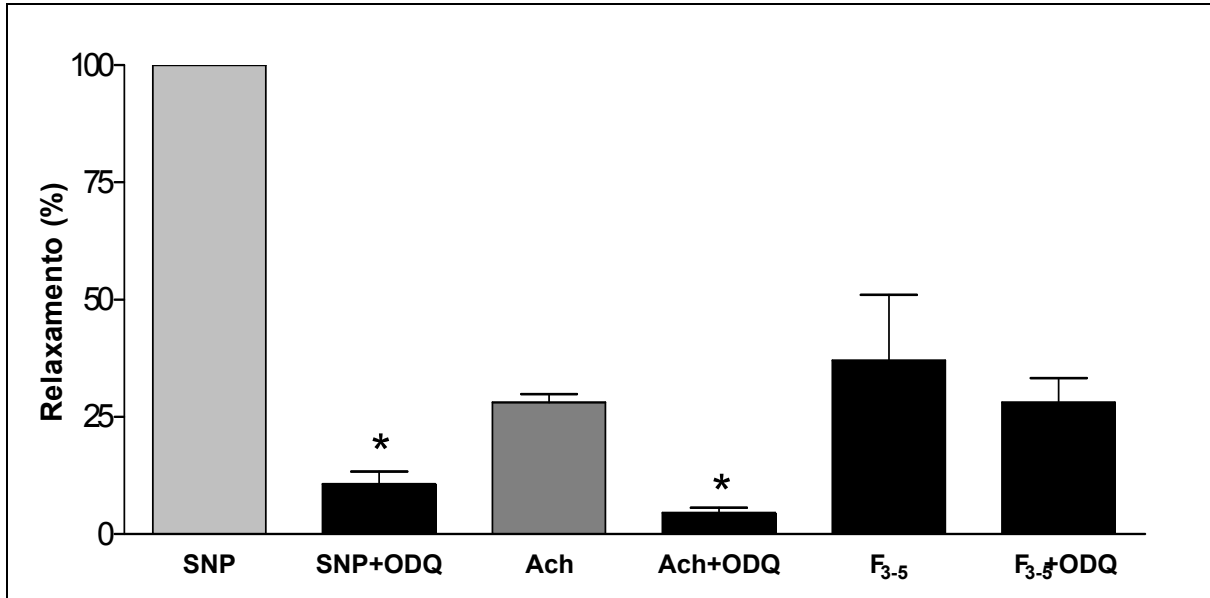


FIGURA 10 – Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de ODQ (n = 4; \* p < 0,05, comparado com o respectivo controle).

	SNP		ACh		F <sub>3-5</sub>	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-	100,00	0,00	28,10	1,80	37,00	14,00
<b>ODQ</b>	10,70	2,70	4,50	1,10	28,10	5,20

TABELA 6 – Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de ODQ (n = 4).

## Experimento V: envolvimento de receptores $\beta$ -adrenérgicos

Na Figura 11, as barras representam as Médias  $\pm$  EPM. Na Tabela 7, estão listados os valores numéricos correspondentes. A superfusão de propranolol inibiu significativamente o relaxamento induzido por isoproterenol, porém não afetou os relaxamentos promovidos por SNP e F<sub>3-5</sub>.

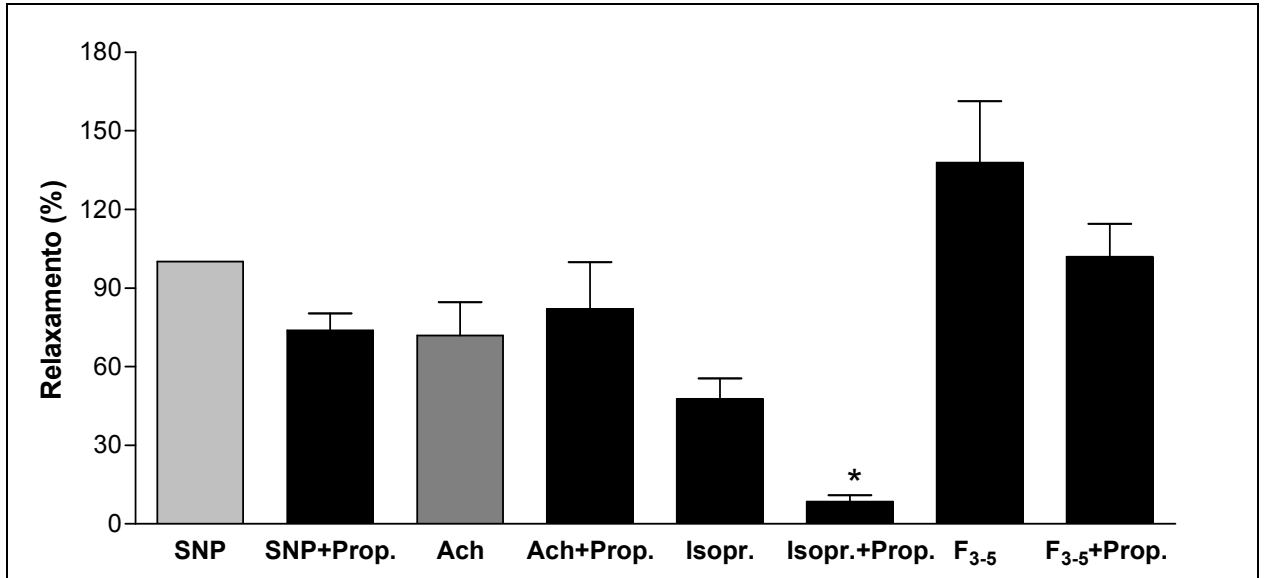


FIGURA 11 – Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh, isoproterenol e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de propranolol (n = 4; \* p < 0,05, comparado com o respectivo controle).

	SNP		ACh		Isoproterenol		F <sub>3-5</sub>	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-	100,00	0,00	71,90	12,50	47,70	7,80	137,80	23,50
<b>Propranolol</b>	73,70	6,50	82,00	17,70	8,50	2,45	101,90	12,60

TABELA 7 – Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh, isoproterenol e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de propranolol (n = 4).



## Experimento VI: envolvimento de receptores muscarínicos

Na Figura 12, as barras representam as Médias  $\pm$  EPM. Na Tabela 8, estão listados os valores numéricos correspondentes. A superfusão de atropina inibiu significativamente o relaxamento mediado pela ACh, entretanto não afetou os relaxamentos promovidos por SNP e F<sub>3-5</sub>.

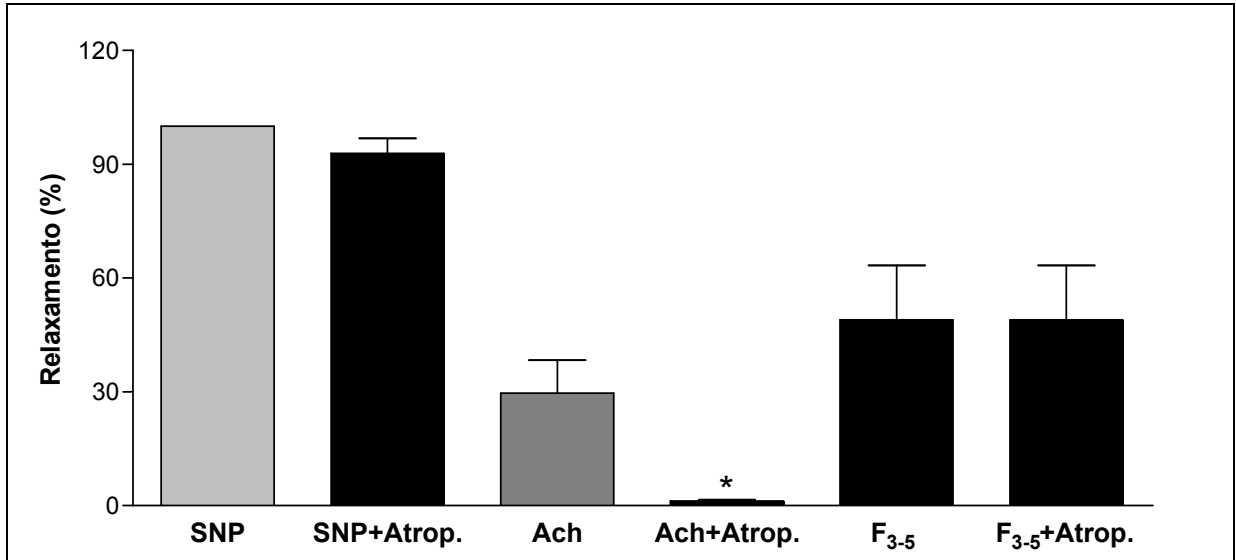


FIGURA 12 – Relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de atropina (n = 4; \* p < 0,05, comparado com o respectivo controle).

	SNP		ACh		F <sub>3-5</sub>	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
-	100,00	0,00	29,70	8,60	49,00	14,30
<b>Atropina</b>	92,80	4,00	1,30	0,30	49,00	14,30

TABELA 8 – Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP, ACh e F<sub>3-5</sub>, isoladamente, e durante superfusão de atropina (n = 4).

## Experimento VII: envolvimento de inibição da PDE5

Na Figura 13, as barras representam as Médias  $\pm$  EPM. Na Tabela 9, estão listados os valores numéricos correspondentes. A superfusão de sildenafil amplificou significativamente os relaxamentos provocados por SNP e ACh. No entanto, a superfusão de F<sub>3-5</sub> foi incapaz de amplificar as respostas relaxantes induzidas por SNP e ACh.

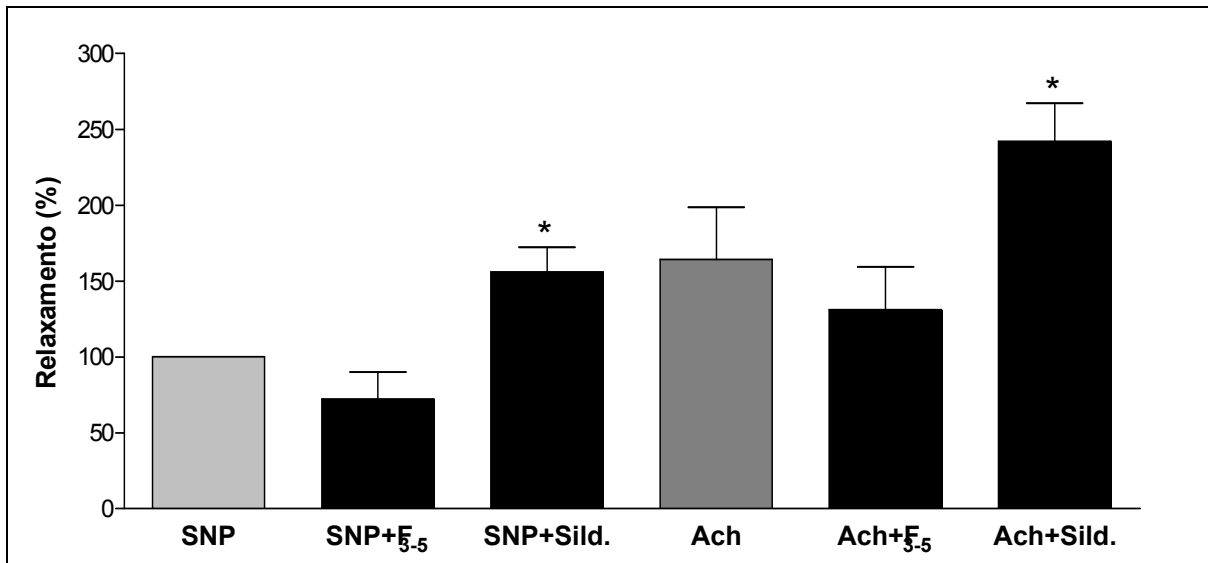


FIGURA 13 – Relaxamentos máximos induzidos por SNP e ACh, isoladamente, e durante superfusão de F<sub>3-5</sub> e sildenafil (n = 6; \* p < 0,05, comparado com o respectivo controle).

	SNP		ACh	
	Média	EPM	Média	EPM
-	100,00	0,00	164,30	34,30
<b>F<sub>3-5</sub></b>	72,20	17,70	131,00	28,40
<b>Sildenafil</b>	156,00	16,30	242,00	25,00

TABELA 9 – Dados numéricos correspondentes aos relaxamentos máximos induzidos por SNP e ACh, isoladamente, e durante superfusão de F<sub>3-5</sub> e sildenafil (n = 6).

### Experimento VIII: envolvimento de canais de cálcio voltagem-dependente

Na Figura 14, as barras representam as Médias  $\pm$  EPM. Na Tabela 10, estão listados os valores numéricos correspondentes. A figura 15 apresenta curvas de dose-resposta, onde os números correspondem às concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , em mM. As contrações promovidas pelo  $\text{CaCl}_2$  foram significativamente inibidas pela incubação com  $\text{F}_{3-5}$ , o que não foi observado em relação ao DMSO.

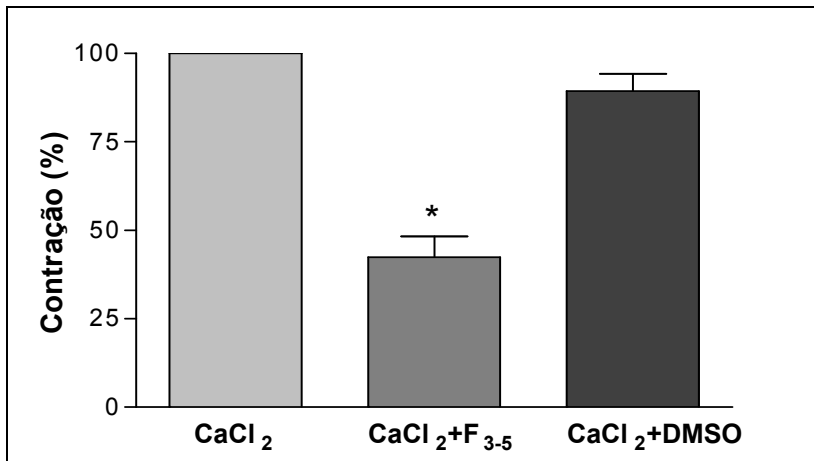


FIGURA 14 – Contrações máximas induzidas pelo CaCl<sub>2</sub>, isoladamente, e após incubação com F<sub>3-5</sub> e DMSO (n = 5; \* p < 0,05, comparado com o respectivo controle).

CaCl <sub>2</sub>		CaCl <sub>2</sub> + F <sub>3-5</sub>		CaCl <sub>2</sub> + DMSO	
Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
100,00	0,00	42,40	5,90	89,36	4,90

TABELA 10 – Dados numéricos correspondentes às contrações máximas induzidas pelo CaCl<sub>2</sub>, isoladamente, e após incubação com F<sub>3-5</sub> e DMSO (n = 5).

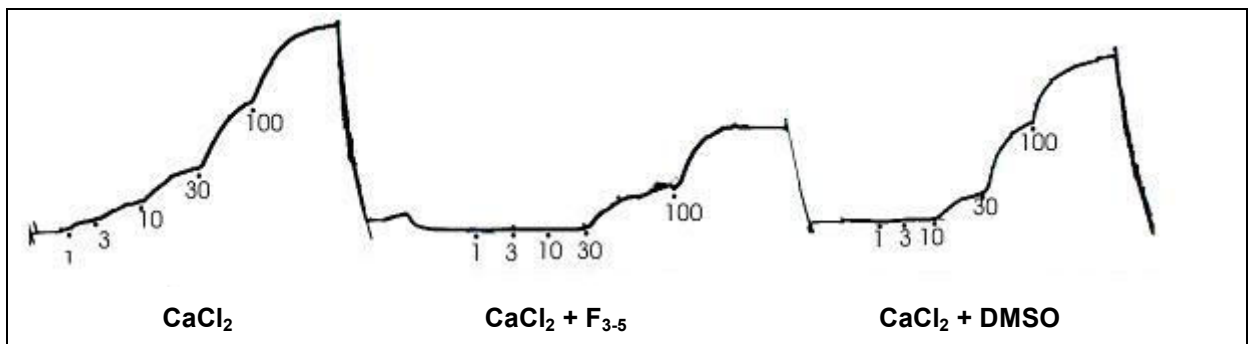


FIGURA 15 – Contrações máximas induzidas por doses crescentes de CaCl<sub>2</sub>, isoladamente, e após incubação com F<sub>3-5</sub> e DMSO (n = 5).

## 5 DISCUSSÃO

*Aspidosperma ulei* Markgr. é uma espécie comum no Brasil, e tem potencial para ser utilizada como fitoterápico de fácil aquisição e baixo custo no tratamento da DE (CAMPOS *et al.*, 2006). Apesar disso, apenas recentemente passou-se a estudá-la com este propósito, o que acentua a relevância de pesquisas sobre suas propriedades farmacológicas. Neste trabalho, foram investigados os efeitos da fração alcaloidal F<sub>3-5</sub> de *Aspidosperma ulei* Markgr. sobre o tecido cavernoso de coelho, *in vitro*. Diversos ensaios funcionais foram realizados, com o intuito de determinar o grau de relaxamento cavernoso induzido por F<sub>3-5</sub>, bem como os possíveis mecanismos farmacológicos implicados.

Os estudos sobre neurotransmissão e fármacos relacionados aos processos de contração e relaxamento do músculo liso cavernoso e da vasculatura peniana têm sido bastante freqüentes, porém a disponibilidade de tecido cavernoso humano é muito restrita (ANDERSSON, 2001). Os pesquisadores geralmente conseguem obter corpos cavernosos humanos a partir de doadores cadáver de órgãos para transplante, ou ainda de pacientes que se submetem a cirurgias de mudança de sexo (SPERLING *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2005). O mais comum, portanto, é a utilização de tecidos de outros mamíferos, mesmo considerando-se que nem todas as informações obtidas a partir dos estudos com animais são diretamente aplicáveis aos seres humanos (SACHS, 2000; STEERS, 2000). O coelho foi escolhido como animal de experimentação, por ser habitualmente utilizado nas pesquisas sobre DE, permitir padronização quanto à raça, sexo e peso, além de fornecer um fragmento de corpo cavernoso adequado aos modelos experimentais empregados (KERFOOT *et al.*, 1993; JEREMY *et al.*, 1997; CHOI; CHUNG; CHOI, 1999).

A planta foi obtida e processada para isolamento de F<sub>3-5</sub> segundo os procedimentos descritos por Campos *et al.* (2006), que demonstraram pela primeira vez as propriedades eretogênicas de *Aspidosperma ulei* Markgr. Estes autores isolaram distintas frações, a partir de um extrato etanólico das cascas da raiz da planta. A fração F<sub>3-5</sub> – composta de três alcalóides: uleína, *nor*-uleína e tetrahidro-3,14,4,21-elipticina – foi utilizada neste estudo, por ter sido apontada como responsável pelos efeitos pró-eréteis.

Para os ensaios funcionais, optou-se pela superfusão de tecido em cascata e pelo banho isolado de tecido, dois modelos experimentais bastante utilizados nas pesquisas sobre a modulação farmacológica dos processos de contração e relaxamento dos corpos cavernosos.

A superfusão de tecido em cascata foi escolhida para os estudos de relaxamento dos corpos cavernosos. Este método possibilita a manutenção das características biológicas dos tecidos por cerca de 24 horas. Além disso, vários fragmentos de tecido cavernoso podem ser testados simultaneamente, sob as mesmas condições. Isto permite a realização de ensaios experimentais que demandem a infusão seqüencial de diversos fármacos, observando-se os efeitos de cada um deles sobre os tecidos, e alternando-se períodos de repouso para equilíbrio (VANE, 1964).

O banho isolado de tecido foi utilizado no ensaio de contração dos corpos cavernosos. Com esta técnica, também se conservam as propriedades biológicas dos tecidos por cerca de um dia inteiro, podendo ser realizados testes simultâneos de várias amostras, com múltiplos fármacos. Entretanto, diferentemente da superfusão de tecido em cascata, neste modelo é possível manter os fragmentos de corpo cavernoso imersos em um meio líquido, cuja composição é precisamente ajustada. Esta particularidade justificou seu uso no experimento de contração muscular, onde a composição iônica do meio era diferente do estado fisiológico (TEIXEIRA, 2001).

Desde a descoberta de um fator de relaxamento dependente do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), posteriormente identificado como óxido nítrico (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987), numerosos estudos têm reforçado seu papel central no relaxamento da musculatura lisa em diversos órgãos (IGNARRO *et al.*, 1987a; IGNARRO *et al.*, 1987b; EKELUND; MELLANDER, 1990; GAW; WADSWORTH; HUMPHREY, 1990; KELM; SCHRADER, 1990; MONCADA, 1990; ANDERSSON; WAGNER, 1995). O SNP é um fármaco que se dissolve espontaneamente em meio aquoso, fornecendo NO diretamente aos tecidos, sem depender das fontes endógenas desta substância (MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997). Ele foi utilizado em todos os ensaios de relaxamento cavernoso como parâmetro de comparação entre as substâncias testadas, servindo de controle interno. Foram observadas diferenças nas sensibilidades dos corpos cavernosos ao relaxamento pelo SNP, entre os experimentos, possivelmente devido



às características intrínsecas dos tecidos. Por este motivo, utilizaram-se doses diferenciadas de SNP (1,30 – 13,00 nM), capazes de provocar um relaxamento inicial completo dos corpos cavernosos.

A princípio, investigou-se a capacidade de promoção do relaxamento dos corpos cavernosos por F<sub>3-5</sub>. A infusão de F<sub>3-5</sub> estimulou o relaxamento das preparações de tecido cavernoso de coelho, de modo consistente e diretamente relacionado ao aumento progressivo das doses. Isso mostra que F<sub>3-5</sub> tem efeito local sobre os tecidos, embora obviamente não se possa descartar, *in vivo*, a presença de mecanismos centrais de estímulo da função erétil por F<sub>3-5</sub>, bem como interações com outros sistemas de neurotransmissão.

A papaverina, *in vivo*, estimula o mecanismo veno-oclusivo peniano, favorecendo as ereções (JUNEMANN *et al.*, 1986; DELCOUR *et al.*, 1987). Além disso, *in vitro*, esta substância é capaz de relaxar os sinusóides e os vasos sanguíneos cavernosos (KIRKEBY; FORMAN; ANDERSSON, 1990). Seu principal mecanismo farmacológico de ação é através de inibição não-seletiva de PDEs (ANDERSSON, 1994). Atualmente, a papaverina é utilizada para o tratamento da DE, através de injeção intracavernosa, com excelentes resultados (ANDERSSON, 2001). Considerando-se o relaxamento cavernoso completo promovido pela papaverina, *in vivo* e *in vitro*, este fármaco foi utilizado como referência para comparação com F<sub>3-5</sub>. Foi observado que, em relação à papaverina, F<sub>3-5</sub> apresentou relaxamentos equivalentes, para doses iguais, exceto na dose máxima de 3 mg, quando induziu relaxamento significativamente superior. Estes achados denotam que, *in vitro*, F<sub>3-5</sub> promove excelente relaxamento dos corpos cavernosos, com magnitude superior à verificada com papaverina.

O DMSO é uma substância incapaz de promover relaxamento ou contração do tecido cavernoso (BARROS, 2005). Tanto F<sub>3-5</sub> como papaverina foram capazes de produzir relaxamentos significativamente superiores às respostas observadas com a infusão do DMSO, para todas as doses utilizadas, a partir de 0,1 mg. Isso demonstra que as substâncias testadas eram, de fato, responsáveis pelos relaxamentos observados.

As fontes endógenas de NO são as fibras nervosas NANC e o endotélio (ANDERSSON; WAGNER, 1995). Atualmente, sabe-se que o NO sintetizado pela nNOS das fibras NANC é responsável pelo relaxamento imediato do tecido cavernoso, enquanto o NO produzido pela eNOS, no endotélio, garante a

manutenção deste relaxamento, durante a ereção fisiológica (ANDERSSON, 2003). Experimentalmente, a liberação de NO pelas fibras NANC pode ser obtida através de estimulação elétrica ou ainda por substâncias com atuação neuronal direta, como o veneno de *Tytus serrulatus*; enquanto que a infusão de ACh é capaz de estimular a produção de NO endotelial (TEIXEIRA, 2001). Desta forma, a ACh foi empregada nos ensaios de relaxamento dos corpos cavernosos, com o intuito de demonstrar a integridade endotelial, condição indispensável para a correta interpretação das respostas provocadas pelas substâncias, em cada experimento.

Inibidores específicos da NOS e da sGC foram utilizados para investigação de um mecanismo de ação nitrérgico de F<sub>3-5</sub>. O L-NAME é um inibidor da NOS, com predileção pela eNOS, e por isso age reduzindo a disponibilidade de NO de origem endotelial (MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997). Como seria esperado, nos corpos cavernosos superfundidos com L-NAME o relaxamento provocado pela ACh foi quase abolido, enquanto o relaxamento estimulado por SNP praticamente não foi afetado. Estes dados indicam que L-NAME efetivamente inibiu a produção endotelial de NO. Como as respostas relaxantes evocadas por F<sub>3-5</sub> não foram influenciadas, nesta situação, pode-se supor que o relaxamento cavernoso por F<sub>3-5</sub> ocorre independentemente do NO endotelial.

O 7-NI é capaz de inibir eNOS e nNOS, porém apresenta seletividade bem maior para esta última, uma vez que é ativamente captado pelos neurônios (BABBEDGE *et al.*, 1993; MOORE *et al.*, 1993; WOLFF; LUBESKIE; UMANSKY, 1994; MONCADA; HIGGS; FURCHGOTT, 1997). De acordo com as observações de Teixeira (2001), 7-NI inibiu o relaxamento promovido através de nNOS, pelo veneno de *Tytus serrulatus*. Durante a superfusão de 7-NI, não houve alterações significantes no efeito de SNP, que não depende do NO endógeno. A ACh também não sofreu interferência de 7-NI, provavelmente devido à menor afinidade deste composto pela eNOS, na dose utilizada. F<sub>3-5</sub> não teve seus relaxamentos dos corpos cavernosos modificados significativamente pela adição de 7-NI, sugerindo que sua ação prescinde a estimulação das fibras NANC.

O ODQ é empregado para demonstrar o envolvimento da via NO-cGMP no relaxamento cavernoso de várias espécies de mamíferos, inclusive o homem (TEIXEIRA *et al.*, 1998; HEDLUND; ALM; ANDERSSON, 1999; MIZUSAWA *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2001). Ele bloqueia seletivamente a sGC, no mesmo sítio utilizado pelo NO, não apresentando efeito sobre a pGC (GARTHWAITE *et al.*, 1995;

BRUNNER *et al.*, 1996; SCHRAMMEL *et al.*, 1996). No tecido cavernoso superfundido com ODQ, observou-se inibição dos relaxamentos provocados por SNP e ACh, uma vez que ambos agem através do NO. Entretanto, o ODQ não afetou as preparações de corpos cavernosos relaxadas com  $F_{3-5}$ . Os resultados deste ensaio indicam que, se  $F_{3-5}$  realmente age por estímulo à síntese do cGMP, provavelmente a via do NO-cGMP não está envolvida, não sendo possível descartar o estímulo à produção do cGMP por atuação de  $F_{3-5}$  em outros sítios da sGC, ou mesmo em pGC.

Teixeira *et al.* (2004) demonstraram a presença de receptores  $\beta$ -adrenérgicos atípicos nos corpos cavernosos de coelho. Estes autores observaram que o isoproterenol, um agonista  $\beta$ -adrenérgico, estimula a produção do cAMP, promovendo um relaxamento do tecido cavernoso superior aos de todos os outros agonistas  $\beta$  testados. Teixeira *et al.* (2004) também conseguiram bloquear os relaxamentos induzidos por isoproterenol com a superfusão de um antagonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo, o propranolol. No presente estudo, observou-se que o isoproterenol teve seus relaxamentos quase abolidos pela superfusão de propranolol, demonstrando a integridade do mecanismo de relaxamento cavernoso mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Entretanto, o propranolol foi incapaz de alterar significativamente os relaxamentos provocados por SNP e ACh, uma vez que estes fármacos utilizam a via nitrérgica. No caso de  $F_{3-5}$ , a superfusão de propranolol também não afetou os relaxamentos, sugerindo que  $F_{3-5}$  não age através dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

O pênis é rico em receptores muscarínicos, dos tipos M1, M2, M3 e M4 (TRAISH *et al.*, 1995). Além de estimular receptores M3 endoteliais, a ACh age em receptores M2 e M4 no músculo liso cavernoso, promovendo o aumento do cAMP (TRAISH *et al.*, 1995). A ACh também atua em receptores muscarínicos presentes nas fibras adrenérgicas, inibindo a liberação de NA (TEJADA *et al.*, 1988, 1989). A atropina é um agente anti-colinérgico por excelência, ligando-se aos receptores muscarínicos e impedindo a ação da ACh, embora, em altas doses, promova o relaxamento cavernoso, *in vitro* (CHOI; CHUNG; CHOI, 1999). No estudo da associação de  $F_{3-5}$  com os receptores muscarínicos, utilizou-se a atropina em dose baixa, observando-se o que seria previsível: os relaxamentos mediados por SNP permaneceram inalterados, enquanto os relaxamentos induzidos pela ACh foram fortemente inibidos, durante a administração de atropina, indicando sua capacidade

de bloqueio dos receptores muscarínicos. Neste ensaio, não foi possível evidenciar um mecanismo de ação dependente de receptores muscarínicos, uma vez que a superfusão de atropina não causou nenhuma interferência sobre os relaxamentos cavernosos estimulados por F<sub>3-5</sub>.

O papel crucial do NO nos relaxamentos do músculo liso e vasos sanguíneos penianos é devido ao estímulo para conversão do GMP em cGMP (TRIGO-ROCHA *et al.*, 1993). O cGMP desencadeia os eventos intracelulares necessários ao relaxamento cavernoso, e tem sua concentração regulada pelo equilíbrio entre síntese e hidrólise, que é realizada pela PDE5, nos corpos cavernosos (BEAVO, 1992). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o sildenafil, um inibidor seletivo da PDE5, amplifica os relaxamentos promovidos pelo NO, ao contribuir para o incremento na concentração de cGMP (JEREMY *et al.*, 1997; CHUANG *et al.*, 1998; BALLARD *et al.*, 1998; MORELAND; GOLDSTEIN; TRAISH, 1998; CARTER; BALLARD; NAYLOR, 1998). No experimento para avaliação deste mecanismo, o sildenafil foi capaz de amplificar os relaxamentos promovidos por SNP e ACh, comprovando o sinergismo de ação entre estes fármacos, que por vias distintas elevam a concentração intracelular do cGMP. No entanto, a superfusão de F<sub>3-5</sub> não amplificou os relaxamentos de SNP e ACh, demonstrando que sua ação provavelmente não está baseada em inibição da PDE5.

A cascata de eventos iniciada pelo cGMP culmina com a queda na concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>, determinando o relaxamento muscular (AYDIN *et al.*, 2001). A membrana da célula muscular lisa é rica em canais iônicos ativos, que se tornam permeáveis de acordo com as variações de polaridade determinadas pela composição do meio (ANDERSSON, 2001). Os canais de cálcio voltagem-dependente contribuem para a manutenção do tônus do músculo liso cavernoso, por permitirem um fluxo contínuo de Ca<sup>2+</sup> para o interior da célula (FOVAEUS; ANDERSSON; HEDLUND, 1987; CHRIST *et al.*, 1989, 1992; NOACK; NOACK, 1997). Já se observou que diversos bloqueadores de canais de cálcio podem relaxar tecido cavernoso de coelho, *in vitro* (KERFOOT *et al.*, 1993). No presente estudo, procurou-se demonstrar este mecanismo com a utilização de preparações de corpos cavernosos incubadas em um meio livre de Ca<sup>2+</sup> e previamente despolarizadas pela adição de K<sup>+</sup> (60 mM) a este meio. Nesta situação, canais de cálcio voltagem-dependente são ativados, o que permite o fluxo deste íon entre os meios intra e extracelular, de acordo com os gradientes de concentração. Ao se acrescentar aos

banhos  $\text{Ca}^{2+}$ , sob a forma de  $\text{CaCl}_2$ , observou-se contração muscular progressivamente maior, a partir da dose de 1 mM, atestando a permeabilidade de canais de cálcio voltagem-dependente. A pré-incubação dos tecidos com DMSO, como seria esperado, não modificou a curva de dose-resposta para as contrações dos corpos cavernosos induzidas pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, a adição prévia de  $\text{F}_{3-5}$  aos banhos modificou bastante a curva de dose-resposta. Nesta situação, as primeiras contrações dos fragmentos de corpos cavernosos só apareceram a partir da dose de 30 mM. Além disso, a média das contrações máximas observadas nos tecidos tratados com  $\text{F}_{3-5}$  foi significativamente inferior às médias das contrações máximas provocadas nos tecidos sem pré-incubação ou incubados com DMSO. Estes dados sugerem que  $\text{F}_{3-5}$  inibiu os efeitos do  $\text{Ca}^{2+}$ , provavelmente por bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependente.

Os ensaios funcionais aqui realizados vêm acrescentar novas informações sobre *Aspidosperma ulei* Markgr. A fração  $\text{F}_{3-5}$  relaxa completamente corpos cavernosos de coelho, *in vitro*, possivelmente através do bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependente, e de modo independente da via nitrérgica, da estimulação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ou muscarínicos, e de inibição da PDE5. Estes dados corroboram as observações pioneiras de Campos *et al.* (2006), que observaram o efeito pró-erétil de  $\text{F}_{3-5}$  em camundongos, com algumas ressalvas no que diz respeito aos mecanismos de ação propostos por estes autores (dopaminérgico, nitrérgico e noradrenérgico). Um mecanismo dopaminérgico, por sua natureza central, não pode ser testado *in vitro*. Quanto à via nitrérgica, há que se considerar as limitações dos estudos *in vivo* para a determinação exata do mecanismo de ação de um fármaco, pois diversos fatores relacionados à via de administração, absorção e interações com outras substâncias no organismo podem interferir com a interpretação dos resultados. Optou-se por não investigar um mecanismo noradrenérgico, apesar das evidências indiretas apresentadas por Sperling *et al.* (2002) em estudos com *Aspidosperma quebracho blanco*, que possui alcalóides similares aos encontrados em *Aspidosperma ulei* Markgr. Estes autores observaram dois componentes responsáveis pelos efeitos da planta: um mecanismo de bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico, bem como outro mecanismo que não foi caracterizado. Além disso, como  $\text{F}_{3-5}$  é composta de três alcalóides, é razoável supor que mais do que um deles possa ter ação eretogênica, com mecanismos farmacológicos distintos.

Portanto, além do bloqueio de canais de cálcio, sugerido pelos resultados deste trabalho, há que se considerar outras possibilidades para explicação dos relaxamentos cavernosos provocados por  $F_{3-5}$ . Primeiramente, é preciso caracterizar o papel de cada um dos alcalóides componentes da fração, de modo a concentrar os estudos nas substâncias com atividade eretogênica. Também é importante a realização de novas pesquisas *in vivo*, para investigação de possíveis ações centrais de  $F_{3-5}$ . Com relação aos mecanismos periféricos de atuação de  $F_{3-5}$ , é interessante investigar as hipóteses de bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico, modulação de canais de potássio, ou ainda atividade sobre a pGC. Maiores conhecimentos sobre *Aspidosperma ulei* Markgr. podem esclarecer melhor a fisiologia e farmacologia da ereção peniana, além de significar uma nova opção terapêutica, potencialmente beneficiando um grande número de pacientes.

## 6 CONCLUSÃO

1. A fração alcaloidal F<sub>3-5</sub> de *Aspidosperma ulei* Markgr. induz o relaxamento completo do corpo cavernoso de coelho, *in vitro*.
2. O relaxamento cavernoso induzido por F<sub>3-5</sub> aparentemente não envolve a via nitrérgica, receptores  $\beta$ -adrenérgicos, receptores muscarínicos ou inibição da PDE5.
3. O relaxamento cavernoso induzido por F<sub>3-5</sub> provavelmente ocorre através do bloqueio de canais de cálcio voltagem-dependente.

## 7 REFERÊNCIAS

ABREU E SILVA, M; OLIVEIRA, AB; SOUZA FILHO, JD; CHIARI, E; BRAGA, FC; LOMBARDI, JA. Isolamento de alcalóides de *Aspidosperma tomentosum* biomonitorado por testes *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. Anais da II Semana da Pós-Graduação da UFMG, 2002.

ADAIKAN, PG; GAUTHAMAN, K; PRASAD, RN; NG, SC. Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* extract on the rabbit corpus cavernosum. Ann Acad Med Singapore, v. 29, p. 22-26, 2000.

ANDERSSON, KE. Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. J Urol, v. 170, p. s6-s14, 2003.

ANDERSSON, KE. Pharmacology of erection: agents which initiate and terminate erection. Sex Disabil, v. 12, p. 53-79, 1994.

ANDERSSON, KE. Pharmacology of penile erection. Pharmacol Rev, v. 53, p. 417-450, 2001.

ANDERSSON, KE; WAGNER, G. Physiology of penile erection. Physiol Rev, v. 75, p. 191-236, 1995.

ANTUNES, E; GORDO, WM; DE OLIVEIRA, JF; TEIXEIRA, CE; HYSLOP, S; DE NUCCI, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama and its constituents. Phytother Res, v. 15, p. 416-421, 2001.

AYDIN, S; OZBEK, H; YILMAZ, Y; ATILLA, MK; BAYRAKLI, H; CETIN, H. Effects of sildenafil citrate, acetylcholine, and sodium nitroprusside on the relaxation of rabbit cavernosal tissue *in vitro*. Urology, v. 58, p. 119-124, 2001.

BABBEDGE, RC; BLAND-WARD, PA; HART, SL; MOORE, PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles. Br J Pharmacol, v. 110, p. 225-228, 1993

BALLARD, SA; GINGELL, CJ; TANG, K; TURNER, LA; PRICE, ME; NAYLOR, AM. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. J Urol, v. 159, p. 2164-2171, 1998.



BANERJEE, JN; LEWIS, JJ. Pharmacological studies in the apocynaceous genus *Aspidosperma* Mart. & Zucc., *Aspidosperma ulei* MGF. J Pharm Pharmacol, v. 7, p. 42-45, 1955.

BARROS, ARC. Efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides isolada de *Aspidosperma ulei* Markgr.: Estudo *in vivo* e *in vitro*. 2005. 197 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BAUMBUSCH, F; PAPP, GK; KOPA, ZS. Treatment for potency problems with Afrodor 2000. Acta Chir Hung, v. 35, p. 87-92, 1995.

BEAVO, JL. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol Rev, v. 75, p. 1650-1653, 1992.

BITSCH, M; KROMAN-ANDERSEN, B; SCHOU, J; SJONTOFT, E. The elasticity and the tensile strength of tunica albuginea of the corpora cavernosa. J Urol, v. 143, p. 642-645, 1990.

BOOLELL, M; GEPI-ATTEE, S; GINGELL, JC; ALLEN, MJ. Sildenafil, a novel oral therapy for male erectile dysfunction. Br J Urol, v. 78, p. 257-261, 1996.

BRAGA, RS; JARDIM, CR. Tratamento da disfunção erétil por auto-injeção. In: Disfunção Sexual Masculina. 1 ed. São Paulo: Instituto H. Ellis, 2002, p. 217-221.

BRUNNER, F; SCHMIDT, K; NIELSEN, EB; MAYER, B. Novel guanylyl cyclase inhibitor potently inhibits cyclic GMP accumulation in endothelial cells and relaxation of bovine pulmonary artery. J Pharmacol Exp Ther, v. 277, p. 48-53, 1996.

CAMPOS, AR; LIMA, RCP Jr; UCHOA, DEA; SILVEIRA, ER; SANTOS, FA; RAO, VSN. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. J Ethnopharmacol, v. 104, p. 240-244, 2006.

CARTER, AJ; BALLARD, SA; NAYLOR, AM. Effect of the selective phosphodiesterase type 5 inhibitor sildenafil on erectile function in the anesthetized dog. J Urol, v. 160, p. 242-246, 1998.

CHOI, YD; CHUNG, WS; CHOI, HK. The action mechanism of relaxation effect of atropine on the isolated rabbit corpus cavernosum. J Urol, v. 161, p. 1976-1979, 1999.

CHRIST, GJ; MAAYANI, S; VALCIC, M; MELMAN, A. Pharmacological studies of

human erectile tissue: characteristics of spontaneous contractions in  $\alpha$ -adrenoceptor responsiveness with age and disease in isolated tissues. *Br J Pharmacol*, v. 101, p. 375-381, 1990.

CHRIST, GJ; MORENO, AP; MELMAN, AP; SPRAY, DC. Gap junction-mediated intercellular diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  in cultured human corporeal smooth muscle cells. *Am J Physiol*, v. 263, p. C373-C383, 1992.

CHRIST, GJ; VALCIC, M; MAAYANI, S; MELMAN, A. Kinetic studies of contraction in human erectile tissue (HET) and rabbit aortic rings in vitro: modulation by papaverine and the dihydropyridine analog nifedipine. *Int J Impot Res*, v. 1, p. 1-10, 1989.

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*, v. 160, p. 257-261, 1998.

CICERO, AF; BANDIERI, E; ARLETTI, R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behavior in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J Ethnopharmacol*, v. 75, p. 225-259, 2001.

CIRINO, G; SORRENTINO, R; DI VILLA BIANCA, R; POPOLO, A; PALMIERI, A; IMBIMBO, C; FUSCO, F; LONGO, N; TAJANO, G; IGNARRO, LJ; MIRONE, V. Involvement of beta-3 adrenergic receptor activation via cyclic GMP – but not NO-dependent mechanisms in human corpus cavernosum function. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 100, p. 5531-5536, 2003.

DAIL, WG. Autonomic innervation of male reproductive genitalia. In: *The Autonomic Nervous System*. London: Harwood, 1993, p. 69-101.

DE GROAT, WC; BOOTH, AM. Neural control of penile erection. In: *The Autonomic Nervous System*. London: Harwood, 1993, p. 465-513.

DELCOUR, C; WESPES, E; VANDENBOSCH, G; SCHULMAN, CC; STRUYVEN, J. The effect of papaverine on arterial and venous hemodynamics of erection. *J Urol*, v. 138, p. 187-189, 1987.

DREWES, SE; GEORGE, J; KHAN, F. Recent findings on natural products with erectile dysfunction activity. *Phytochemistry*, v. 62, p. 1019-1025, 2003.

EKELUND, U; MELLANDER, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the

regulation of tonus in large-bore arterial resistance vessels, arterioles and veins in cat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, v. 140, p. 301, 1990.

FOVAEUS, M; ANDERSSON, KE; HEDLUND, H. Effects of some calcium channel blockers on isolated human penile erectile tissue. *J Urol*, v. 138, p. 1267-1272, 1987.

FURCHGOTT, RF; ZAWADSKY, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle to acetylcholine. *Nature*, v. 288, p. 373-376, 1980.

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*, v. 48, p. 184-188, 1995.

GAW, AJ; WADSWORTH, RM; HUMPHREY, PPA. Vasoactive intestinal polypeptide relaxation of sheep cerebral artery is inhibited by L-NNMA. *Blood Vessels*, v. 27, p. 37, 1990.

GIULIANO, F; RAMPIM, O; JARDIN, A; POUSSEAU, JP. Electrophysiological study of relations between the dorsal nerve of the pênis and the lumbar sympathetic chain in the rat. *J Urol*, v. 150, p. 1960-1974, 1993.

HEDLUND, P; ALM, P; ANDERSSON, KE. NO synthase in cholinergic nerves and NO-induced relaxation in the rat isolated corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*, v. 127, p. 349-360, 1999.

HNATYSZYN, O; MOSCATELLI, V; GARCIA, J; RONDINA, R; COSTA, M; ARRANZ, C; BALASZCZUK, A; FERRARO, G; COUSSIO, JD. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of guinea pig. *Phytomedicine*, v. 10, p. 669-674, 2003.

HSU, GL; BROCK, G; MARTINEZ-PINEIRO, L; NUNES, L; HEYDEN, BV; LUE, TF. The three-dimensional structure of the human tunica albuginea: anatomical and ultrastructural levels. *Int J Impot Res*, v. 4, p. 117-129, 1992.

IGNARRO, LJ. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels*, v. 28, p. 67-73, 1991.

IGNARRO, LJ; BUGA, GM; WOOD, KS; BYRNS, RE; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.

Proc Natl Acad Sci USA, v. 84, p. 9265, 1987a.

IGNARRO, LJ; BYRNS, RE; BUGA, GM; WOOD, KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*, v. 61, p. 866-879, 1987b.

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 cavernosum in vitro. *Br J Urol*, v. 79, p. 958-963, 1997.

JUENEMANN, KP; LUE, TF; FOURNIER, GR Jr; TANAGHO, EA. Hemodynamics of papaverine- and phentolamine-induced penile erection. *J Urol*, v. 136, p. 158-161, 1986.

KELM, M; SCHRADER, J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*, v. 66, p. 1561, 1990

KERFOOT, WW; PARK, HY; SCHWARTZ, LB; HAGEN, PO; CARSON, CC 3<sup>rd</sup>. Characterization of calcium channel blocker induced smooth muscle relaxation using a model of isolated corpus cavernosum. *J Urol*, v. 150, p. 249-252, 1993.

KIRKEBY, HJ; FORMAN, A; ANDERSSON, KE. Comparison of the papaverine effects on isolated human penile circumflex veins and corpus cavernosum. *Int J Impot Res*, v. 2, p. 49-54, 1990.

KLINGE, E; SJOSTRAND, NO. Suppression of the excitatory adrenergic neurotransmission; a possible role of cholinergic nerves in the retractor penis muscle. *Acta Physiol Scand*, v. 100, p. 368-376, 1977.

KUTHE, A; REINECKE, M; UCKERT, S; BECKER, A; DAVID, I; HEITLAND, A; STIEF, CG; FORSSMAN, WG; MAGERT, HJ. Expression of guanylyl cyclase B in the human corpus cavernosum penis and the possible involvement of its ligand C-type natriuretic polypeptide in the induction of penile erection. *J Urol*, v. 169, p. 1918-1922, 2003.

LEHNER, H; SCHMUTZ, J. Dihydro-olivacin um dihydro-elipticin (u-alkaloid D) aus *Aspidosperma ulei* MGF. *Helvetica Chimica Acta*, v. 44, p. 444-446, 1961.

LUE, TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. In: *Campbell's Urology*. 8 ed. Philadelphia: Saunders, 2002, p. 1591-

1618.

MCINTOSH, TK; VALLANO, ML; BARFIELD, RJ. Effects of morphine,  $\beta$ -endorphin and naloxone on catecholamine levels and sexual behavior in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 13, p. 435-441, 1980.

MCKAY, D. Nutrients and botanicals for erectile dysfunction: examining the evidence. *Altern Med Rev*, v. 9, p. 4-16, 2004.

McKENNA, KE. Central control of penile erection. *Int J Impot Res*, v. 10, p. S25-S34, 1998.

MELIS, MR; SPANO, MS; SUCCU, S; ARGIOLAS, A. Activation of gamma-aminobutyric acid receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus reduces apomorphine-, N-methyl-D-aspartic acid- and oxytocin-induced penile erection and yawning in male rats. *Neurosci Lett*, v. 281, p. 127-130, 2000.

MELIS, MR; SUCCU, S; IANUCCI, U; ARGIOLAS, A. Oxytocin increases nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of male rats: correlation with penile erection and yawning. *Regul Pept*, v. 69, p. 105-11, 1997.

MILLER, MA; MORGAN, RJ; THOMPSON, CS; MIKHAILIDIS, DP; JEREMY, JY. Effects of papaverine and vasointestinal polypeptide on penile and vascular cAMP and cGMP in control and diabetic animals: an in vitro study. *Int J Impot Res*, v. 7, p. 91-100, 1995.

MIZUSAWA, H; HEDLUND, P; HAKANSSON, A; ALM, P; ANDERSSON, KE. Morphological and functional in vitro and in vivo characterization of the mouse corpus cavernosum. *Br J Pharmacol*, v. 132, p. 1333-1341, 2001.

MONCADA, S. The First Robert Furchgott Lecture: From endothelium-dependent relaxation to the L-Arginine/NO Pathway. *Blood Vessels*, v. 27, p. 208, 1990.

MONCADA, S; HIGGS, A; FURCHGOTT, R. XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*, v. 49, p. 137-142, 1997.

MOORE, PK; WALLACE, P; GAFFEN, Z; HART, SL; BABBEDGE, RC. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol*, v. 110, p. 219-224, 1993.

MORALES, A; PAGANI, E; GLINA, S. Tratamento oral para a disfunção erétil: uma história de evolução. In: *Disfunção Sexual Masculina*. 1 ed. São Paulo: Instituto H. Ellis, 2002, p. 187-215.

MOREIRA, ED Jr; ABDO CH; TORRES, EB; LOBO CF; FITTIPALDI, JA. Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior. *Urology*, v. 58, p. 583-588, 2001.

MORELAND, RB; GOLDSTEIN, I; TRAISH, A. Sildenafil: a novel inhibitor of phosphodiesterase type 5 in human corpus cavernosum smooth muscle cells. *Life Sci*, v. 62, p. 309-318, 1998.

MULHALL, JP; DALLER, M; TRAISH, AM; GUPTA, S; PARK, K; SALIMPOUR, P; PAYTON, TR; KRANE, RJ; GOLDSTEIN, I. Intracavernosal forskolin: role in management of vasculogenic impotence resistant to standard 3-agent pharmacotherapy. *J Urol*, v. 158, p. 1752-1758, 1997.

NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA*, v. 270, p. 83-90, 1993.

NOACK, T; NOACK, P. Multiple types of ion channels in cavernous smooth muscle. *World J Urol*, v. 15, p. 45-49, 1997.

PAGANI, E; DI DIO, LJA. Bases biomorfológicas e fisiologia da ereção. In: *Disfunção Sexual Masculina*. 1 ed. São Paulo: Instituto H. Ellis, 2002, p. 25-33.

PALMER, RMJ; FERRIGE, AG; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 524-526, 1987.

PEHEK, EA; THOMPSON, JT; EATON RC; BAZZET, TJ; HULL, EM. Apomorphine and haloperidol, but not domperidone, affect penile reflexes in rats. *Pharmacol Biochem Res*, v.31, p. 201-208, 1988.

ROSEN, RC; FISHER, WA; EARDLEY, I; NIEDERBERGER, C; NADEL, A; SAND, M. The multinational Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (MALES) study: I. Prevalence of erectile dysfunction and related health concerns in the general population. *Curr Med Res Opin*, v. 20, p. 607-617, 2004.

SACHS, BD. Contextual approaches to the physiology and classification of erectile function, erectile dysfunction, and sexual arousal. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 24, p. 541-560, 2000.

SACHS, BD; MEISEL, RL. The physiology of male sexual behavior. In: The physiology of reproduction. New York: Raven, 1988, p. 1393-1485.

SCHMUTZ, J; HUNZIKER, F; HIRT, R. Ulein, das hauptalkaloid von *Aspidosperma ulei* Mgf. Helvetica Chimica Acta, v. 40, p. 1189-1200, 1957.

SCHRAMMEL, A; BEHRENDTS, S; SCHMIDT, K; KOESLING, D; MAYER, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Mol Pharmacol, v. 50, p. 1-5, 1996.

SILVA, LF. Fentolamina: aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmica no corpo cavernoso humano. 2003. 197 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003

SILVA, LF; NASCIMENTO, NR; FONTELES, MC, DE NUCCI, G; MORAES, ME; VASCONCELOS, PR; MORAES, MO. Phentolamine relaxes human corpus cavernosum by a nonadrenergic mechanism activating ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. Int J Impot Res, v. 17, p. 27-32, 2005.

SIRONI, G; COLOMBO, D; POGGESI, E; LEONARDI, A; TESTA, R; RAMPIM, O; BERNABE, J; GIULIANO, F. Effects of intracavernous administration of selective antagonists of alpha(1)-adrenoceptor on erection in anesthetized rats and dogs. J Pharmacol Exp Ther, v. 292, p. 974-981, 2000.

SOARES, KCN; MASUDA, ET; RATTMAN, YD; SOUZA, M; VELA, WM; RIECK, L; DA SILVA-SANTOS, JE. Efeitos da uleína sobre a contratilidade do músculo liso: envolvimento dos canais de cálcio. Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2004.

SPERLING, H; LORENTZ, A; KREGGE, S; ARNDT, R; MICHEL, MC. An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile  $\alpha$ -adrenoceptors. J Urol, v. 168, p. 160-163, 2002.

STEERS, WD. Neural pathways and central sites involved in penile erection: neuroanatomy and clinical implications. Neurosci Biobehav Rev, v. 24, p. 507-516, 2000.

TAM, SW; WORCEL, M; WYLLIE, M. Yohimbine: a clinical review. Pharmacol Ther, v. 91, p. 215-243, 2001.

TEIXEIRA, CE. Papel do óxido nítrico na ereção peniana. Envolvimento de fibras

nitrérgicas e do endotélio. 2001. 203 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

TEIXEIRA, CE; BARACAT, JS; ZANESCO, A; ANTUNES, E; DE NUCCI, G. Atypical beta-adrenoceptor subtypes mediate relaxations of rabbit corpus cavernosum. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 309, p. 587-593, 2004.

TEIXEIRA, CE; BENTO, AC; LOPES-MARTINS, RAB; TEIXEIRA, AS; VON EICKESTEDT, V; MUSCARÁ, MN; ARANTES, EC; GIGLIO, JR; ANTUNES, E; DE NUCCI, G. *Tytus serrulatus* scorpion venom relaxes the isolated rabbit corpus cavernosum by activating NANC nitrergic nerve fibers. *Br J Pharmacol*, v. 123, p. 435-442, 1998.

TEIXEIRA, CE; FARO, R; MORENO, RA; RODRIGUES NETTO, N Jr; FREGONESI, A; ANTUNES, E; DE NUCCI, G. Nonadrenergic, noncholinergic relaxation of human isolated corpus cavernosum induced by scorpion venom. *Urology*, v. 57, p. 816-820, 2001.

TEJADA, IS; BLANCO, R; GOLDSTEIN, I; AZADZOI, K; MORENAS, A; KRANE, RJ. Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. *Am J Physiol*, v. 254, p. H459, 1988.

TEJADA, IS; KIM, N; LAGAN, I; KRANE, R; GOLDSTEIN, I. Regulation of adrenergic activity in penile corpus cavernosum. *J Urol*, v. 142, p. 1117, 1989.

TEJADA, IS; KIM, NN; GOLDSTEIN, I; TRAISH, AM. Regulation of pre-synaptic alpha adrenergic activity in the corpus cavernosum. *Int J Impot Res*, v. 12, p. S20-S25, 2000.

TELÖKEN, C. Próteses penianas – histórico. In: *Disfunção Sexual Masculina*. 1 ed. São Paulo: Instituto H. Ellis, 2002, p. 249-253.

TODA, N; AYAJIKI, K; FUJIOKA, H; OKAMURA, T. Ginsenoside potentiates NO-mediated neurogenic vasodilation of monkey cerebral arteries. *J Ethnopharmacol*, v. 76, p. 109-113, 2001.

TRAISH, AM; PALMER, MS; GOLDSTEIN, I; MORELAND, RB. Expression of functional muscarinic acetylcholine subtypes in human corpus cavernosum and in cultured smooth muscle cells. *Receptor*, v. 5, p. 159-176, 1995.

TRIGO-ROCHA, F; HSU, GL; DONATUCCI, CF; LUE, TF. The role of cyclic



adenosine monophosphate, cyclic guanosine monophosphate, endothelium and nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission in canine penile erection. *J Urol*, v. 149, p. 872-877, 1993.

VANE, JR. The use of isolated organs for detecting active substances in the circulating blood. *Br J Pharmacol Chemother*, v. 23, p. 360-373, 1964.

WAINBERG, J. Contributions to the clinical validation of the traditional use of *Ptychopetalum* species. *Annals of the 1<sup>st</sup> International Congress on Ethnopharmacology*, 1990.

WALSH, PC; BRENDLER, CB; CHANG, T; MARSHALL, FF; MOSTWIN, JI; STUTZMAN, R; SCHLEGEL, PN. Preservation of sexual function in men during radical pelvic surgery. *Md Med J*, v. 39, p. 389-393, 1990.

WOLFF, DJ; LUBESKIE, A; UMANSKY, S. The inhibition of the constitutive bovine endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. *Arch Biochem Biophys*, v. 314, p. 360-366, 1994.

ZHU, JS; HALPERN, GM; JONES, K. The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis*: part II. *J Altern Complement Med*, v. 4, p. 429-457, 1998.